

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS. DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA

**NUEVAS FUNCIONES CELULARES DE GRKs:
IMPLICACIONES FISIO-PATOLÓGICAS**

MARÍA JURADO PUEYO

Memoria Presentada por la licenciada

MARÍA JURADO PUEYO

para aspirar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Directores de esta tesis:

Dr. FEDERICO MAYOR MENÉNDEZ

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid

Dra. CRISTINA MURGA MONTESINOS

Profesora Contratada Doctora

Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2010

EL PRESENTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR/CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CSIC-UAM) DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, CON LA AYUDA DE UNA BECA DE LA FUNDACIÓN RAMÓN ARECES, UNA BECA ASOCIADA A PROYECTO DEL FONDO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA Y FONDOS DE LA RED CARDIOVASCULAR RECAVA, AMBOS PROGRAMAS PERTENECIENTES AL INSTITUTO DE SALUD CARLOS III.

A mi madre
A Marcos

“Se debe hacer todo tan sencillo como sea posible,
pero no más sencillo”. Albert Einstein

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a Fede por acogerme en su laboratorio, y por enfocar este trabajo con ilusión y optimismo. Para mí, has sido un "jefe" ejemplar por tu respeto, cariño y sentido del humor, y quiero agradecerte el haber valorado mi trabajo incluso en las "malas rachas" de resultados. Tus aportaciones a esta tesis han sido muy enriquecedoras, y agradezco enormemente tus ideas y críticas, siempre constructivas.

A mi "jefa", Cris, por estar pendiente de los detalles hasta casi mimarme y por tus constantes ánimos. Por valorar tanto mi trabajo, por tu comprensión, respeto y cariño.

A Sandra Peregrín, Mari Carmen Jiménez y Anna Aragay, porque comenzasteis buena parte del trabajo que presento y, sin vosotras, esta tesis no hubiera sido posible.

A Toña, Carmen, Natalia, Laura, Raquel, Yulen, Pablo, Idoia, Cristina y demás compañeros del CIMA de Pamplona, por acogerme con tanto calor, enseñarme tanto y por sacarme de pinchos.

A Annemieke, Cobi y Wendy, de la Universidad de Utrecht, al Dr. Jiménez-Borreguero, del Hospital Universitario de La Princesa, y a Paulino y Eduardo, del Grupo de Modelado Molecular, por vuestra inestimable colaboración. A Iria, de la Unidad de Genómica del CNB, por tus consejos, y a Juan Carlos Oliveros, por tu guía, apoyo y simpatía.

Gracias también a Sonia, Iria, Lucía y Rocio, de la facultad de Farmacia de la UCM, por nuestra interesante colaboración y vuestro cariño, y a Marga, brillante jefa de línea que nos ha dejado demasiado pronto.

Al personal del Animalario del CBM, en especial a Javier Palacín, por facilitar siempre mi trabajo y ser encantador. A Juanjo y Fernando, por vuestra simpatía y por ayudarme tantísimo en el manejo de los animales.

A Fernando y Laura, del Servicio de Genómica, porque sois estupendos. Al personal del Servicio de Informática, en especial a Santi, por ser siempre tan eficiente y cariñoso conmigo. Al personal del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal, por vuestra ayuda e infinita paciencia. Al personal del Servicio de Compras, por hacer tan bien vuestro trabajo. A Teo, al personal de Mantenimiento y al personal

de Instrumentación, en particular a Paco, por vuestra colaboración. A Charo, de la Biblioteca, al personal de Fotografía, de Seguridad Biológica y al personal de Lavado y Esterilización, por vuestra ayuda. A JAL, por tu disposición. A Grego y M^a José, por simpáticas. A M^a Jesús y Manolo, por alegrarme la entrada y la salida del CBM. Al personal de Administración, en especial a Belén y Miguel, por vuestra ayuda, y a Mada y Reyes por facilitarme los trámites y hacerme la vida más fácil.

Estos años no hubieran sido lo mismo sin mis compañeros "de pasillo", gracias por alegrarme el camino. Tampoco sin mis compañeros de cultivos del C-V, Isabela, Paloma, Elena, Alberto, Paco, Chirli, Raquel. Gracias también al resto del personal del CBM que ha hecho mi estancia en este centro más agradable.

Gracias a mis amigos de Biología. Patricia, Rut, Maite, Marta, Jesús, Dani, Ramón, Serio, Yulian, Ana, Leyre, Víctor, Alberto, Mamen, Vane, Sara, Lorena y a los demás, por estar siempre allí, por tantos momentos buenos, y por todo lo que nos queda por disfrutar juntos. A Mon, mi hermanita, por todo lo que hemos vivido juntas. A Fer, por hacerle feliz. Gracias también a los cachorrillos biólogos, Javichu, Irene, Carlos, al futuro bebé de Dani y a Martín y Juan.

A mis amigos de Bioquímica, porque os aprecio un montón. A Olga y Javi, mis "vecinos", por vuestra simpatía y vuestros ánimos. A Vanessa y Emil, por estar cerca a pesar de estar tan lejos. A Erika, Carolina y Teresa, por habernos reencontrado.

A Roki, por ser única y alegrarme la vida. A Chuchi, Sergio, Mariano, Modes, Ernesto, Nani, Larre, M^a Carmen, Loli, Paco, Gilda, Luis, Chico, Ana y Miguel, por vuestra amistad, y a los pequeños Darío, Lucía y Paula. A los amigos de Mordor Sonoro, por vuestro apoyo y vuestra inquietud musical.

A Santi, Inma y David, por vuestro cariño y ayuda, por acogerme así, por los colémbolos y por ser geniales.

A todas las personas que han trabajado en nuestro laboratorio durante esta tesis. A Espe y Antonio, por vuestra experiencia. A Ana, Isa y a los estudiantes, por vuestra simpatía. A Alejandro por tu ayuda.

A Susana y Paula, por vuestro inestimable apoyo. A Pedro, por tu complicidad y ayuda, y porque me has enseñado muchísimo. A Raúl, por todos los buenos momentos, y por estar siempre dispuesto a ayudarme. A Guzmancito, por tus locuras y tu música, por ser como eres. A las pequeñas Elisa y Laura, por ser la alegría del laboratorio y por vuestro cariño.

A Ana Ruíz, por toda tu ayuda, tanto en la poyata como fuera del laboratorio, por estar siempre allí, por todos tus consejos, tu paciencia, tu cariño, por las tazas para el café y por mimarnos de esa manera.

A Nila, por tu experiencia y tu constante apoyo, por saber tantísimo, por tus consejos científicos y no científicos, y por ser tan cariñosa.

A Catiuska, por tu alegría, por ser tan buena, por todo lo que sabes, por nuestra "terapia", y por ser así de especial.

A Ivette y Vanesa, las más estilosas, por vuestra simpatía y vuestra ayuda, por las risas que hemos compartido y por vuestro compañerismo.

A Helena, Carlota, Ali y Verito, las mejores compañeras de poyata del mundo, por vuestra amistad y todo lo que hemos compartido, por vuestra complicidad, por ayudarme tantísimo, por estar tan locas y tan cuerdas, y por vuestra alegría. A Elvira, por ser tan divertida.

Gracias también a los cachorrillos del laboratorio, Rubén, Miguel y Sofía. Santi y Rodri son ya unos mozos, pero gracias a ellos también.

Quiero agradecer también su apoyo a la familia de Javi. A Emi y Ricardo, por tratarme como a una hija. A Richi, Chiru, al pequeño Miguel, a Sonia y a David, por ser tan simpáticos y alegres. A Moni, por ser tan buena gente y por nuestros "chimis".

Gracias a todos mis tíos y tías por

vuestros ánimos y apoyo. A Perico y Carmen, por ser como son, a Rafa y Mari Carmen, Pepe Luis y Leles, a Cuchi, Jesús y a Rafi. Gracias, Paco, que eres un tío más. A Jose Luis y Rosa Mari, que os quiero mucho. A Nina, por ser tan buena y por todo lo que has hecho por mí. A mis primos y primas, porque sois los mejores.

A mis yayos de Uncastillo, Domingo y Encarna, porque habéis sido fundamentales en mi vida, por ser tan buenos y saber tanto. Yaya, no sabes cuánto te echo de menos. A yayo Pepe y yaya Rosarito, por todo el cariño que me disteis.

A mis hermanos, por ser dos pilares fundamentales en mi vida, por vuestro apoyo y por todo, os quiero muchísimo. A mis cuñadas, Laura e Irene, por ser tan cariñosas.

A mi padre, por dárnoslo todo, por ser tan particular y tan bueno, y por toda tu ayuda.

A mi madre, a quien más tengo que agradecer. Ojalá pudiera decirte que te debo todo lo que soy, que te agradezco mucho todo lo que hiciste por mí, y que no he podido tener una madre mejor. No te puedo echar más de menos.

Por último, quiero agradecer a Marcos y a Javi su existencia, porque con vosotros mi vida cobra sentido.

Gracias, Marcos, por hacerme tan feliz y por todos los ánimos que me has dado en la última etapa de la tesis, a pesar de no saber aún hablar. Te lo agradezco mucho, tesoro.

Javivi, tú eres mi mayor sostén, y no encuentro palabras que hagan justicia a todo lo que te quiero agradecer. Gracias por tu apoyo incondicional, por tus cuidados y tus mimos, por ser como eres. Gracias por tu sentido del humor, por tener esa cabecita, por tu bondad, por darme a Marcos, por todo lo que hemos vivido y lo que nos queda por delante, por soportarme, gracias, gracias. Tenerte a mi lado es una enorme suerte.

Resumen / Summary

En los últimos años, se están descubriendo un número creciente de funciones celulares adicionales para las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), inicialmente conocidas por su participación en la desensibilización de estos receptores.

En este trabajo, aportamos nuevos datos sobre interacciones funcionales entre GRKs y MAPKs. En primer lugar, describimos que GRK5 es capaz de regular funciones celulares dependientes de la subunidad $\alpha_{12/13}$ de las proteínas G heterotriméricas, a través de su interacción con esta proteína preferentemente en su estado no activo. La fosforilación de GRK5 en S114, por ERK MAPK u otras quinasas, parece aumentar la afinidad de GRK5 por la forma activa de $G\alpha_{12}$.

Por otro lado, al inicio de esta tesis nuestro grupo describió que GRK2 fosforila a la MAPK p38, inhibiendo su activación y actividad. En el presente trabajo, detectamos cambios en la fosforilación inhibitoria de p38 por GRK2 en procesos como la diferenciación de células adipocíticas y en la secreción de citoquinas inflamatorias por macrófagos en respuesta a LPS. Hemos generado nuevos fosfo-anticuerpos para mejorar la detección de esta fosforilación y explorar otros procesos en los que podría estar implicada. En general, no hemos hallado correspondencia entre los niveles de GRK2 o estímulos que activan esta quinasa y la señal detectada por los fosfo-anticuerpos anti-pT123-p38, indicando que este proceso debe de ser muy dinámico, muy específico de contexto celular o modulado por factores adicionales. Sin embargo, sí hemos detectado diferencias en el nivel de pT123-p38 en cardiomiocitos estimulados con isoproterenol, así como en determinados tipos celulares en situación "basal", aunque nos queda por definir el significado biológico de estas diferencias.

Por último, hemos descrito que GRK2 interacciona directamente y en células con MEK, y que esta asociación es más estable cuando MEK está activa. El efecto inhibitorio de GRK2 sobre ERK es principalmente independiente de la actividad quinasa de GRK2 en varios tipos celulares tales como células epiteliales, esplenocitos y

astrocitos. Sin embargo, GRK2 no altera significativamente la fosforilación de ERK por MEK *in vitro*. Estos resultados, junto con otros descritos en esta memoria, parecen indicar que GRK2 puede estar secuestrando a MEK en determinadas localizaciones subcelulares.

Por otro lado, hemos analizado el efecto de la reducción crónica a nivel sistémico de los niveles de la proteína GRK2 en la patofisiología cardíaca, utilizando como modelo ratones hemicigotos GRK2+/- . La disminución en los niveles de GRK2 induce el desarrollo de una hipertrofia cardíaca temprana con la edad, que parece ser de tipo compensado y no patológico, dado que no existe presencia de fibrosis o disfunción cardíaca aparente según un estudio ecocardiográfico.

Además, detectamos a los 9 meses una reprogramación de la expresión génica en ratones GRK2+/- , con una reducción en la expresión de genes fetales indicativos de remodelado patológico, así como un aumento en la expresión de marcadores de funcionalidad cardíaca, de tipo cardioprotector.

La vía de señalización cardioprotectora de MEK-ERK se encuentra sobre-activada a nivel basal en ratones hemicigotos para GRK2 a los 9 meses. Además, los ratones GRK2+/- muestran hipersensibilidad a insulina con un mayor incremento en la fosforilación de componentes de esta ruta a diferentes niveles en corazón en respuesta a un tratamiento agudo con esta hormona. Por el contrario, los niveles de GRK2 están aumentados en muestras de pacientes con síndrome metabólico.

Estos datos apoyan la existencia de una inhibición de la vía de insulina por GRK2 a distintos niveles. Puesto que la vía de insulina media crecimiento tisular y es cardioprotectora, y dado que GRK2 inhibe la ruta de ERK tanto a nivel basal como inducida por insulina, el conjunto de nuestros datos puede explicar que en animales con menores niveles de GRK2 la hiperactivación de estas rutas promueva el desarrollo de hipertrofia cardíaca y que ésta sea de tipo compensado.

An increasing number of cellular functions have been proposed in the last few years for G protein-coupled receptor kinases (GRKs), a family of proteins that were initially described by their role in GPCR desensitization.

In the present work, we provide new insights into the functional interactions between GRKs and Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs). First, we describe that GRK5 is able to modulate certain $G_{12/13}$ -dependent cellular functions through the interaction of GRK5 with this heterotrimeric G protein subunit, which is stabilized by the inactive state of $G_{12/13}$. GRK5 phosphorylation in S114, by ERK MAPK or other kinases, seems to increase the affinity of GRK5 for the active state of G_{12} .

In addition, in the beginning of this thesis, we described a new modulatory phosphorylation of p38 MAPK in Thr123, which was carried out by GRK2, that inhibits both p38 activation and activity. In this work, we have detected changes in the inhibitory phosphorylation of p38 by GRK2 in some cellular processes such as adipocytic cell differentiation or in the secretion of inflammatory cytokines by macrophages in response to lipopolysaccharide. We have generated a new pool of phospho-antibodies, in order to improve the detection of this phosphorylation, and to explore other cellular processes in which it may be involved. In the majority of the conditions tested, we have not been able to detect any correlation between GRK2 levels, or GRK2 stimulation by different means, and the detection of phospho-T123-p38, which indicates that this phosphorylation might be extremely dynamic, context-specific, or modulated by additional factors. Nevertheless, we have detected differences in pT123-p38 levels in isoproterenol-stimulated cardiomyocytes, and also basally in some other cellular types, although the biological meaning of these differences needs to be defined in more depth.

We have also described that GRK2 interacts with MEK directly, and that this association is stabilized by the active state

of MEK. Through this mechanism, GRK2 inhibits the activation of ERK in different cell types such as epithelial cells, splenocytes or astrocytes, mainly in a kinase activity-independent manner. However, GRK2 does not affect ERK phosphorylation *in vitro*, which together with other results described in this thesis suggests that GRK2 might sequester MEK in particular subcellular localizations.

On the other hand, we have analyzed the effect of a chronic and systemic reduction of GRK2 levels in cardiac patho-physiology, using GRK2 \pm hemizygous mice as a model. A decrease in GRK2 levels induces the development of an early hypertrophic phenotype, which seems to be of a compensated non-pathological type, since no fibrosis or cardiac dysfunction, as analyzed by echocardiography, were detected.

In addition, at the age of 9 months we observe a genetic reprogramming in GRK2 \pm mice, with a reduction of some fetal genes indicative of pathological remodelling, and an increase in the transcription of cardio-protective markers.

The cardio-protective signalling pathway MEK-ERK is basally over-activated in GRK2 \pm mice at the age of 9 months. These mice also show insulin hypersensitivity in cardiac tissue, with a higher increase of the phosphorylation of insulin pathway components at different levels in response to an acute insulin treatment. On the contrary, GRK2 levels are increased in blood samples obtained from metabolic syndrome patients.

In sum our data support the existence of an inhibition of the insulin pathway by GRK2 at different levels. As this hormone mediates tissue growth and has cardio-protective effects, and taking into account GRK2 inhibits ERK pathway both at a basal state and after insulin stimulation, altogether these findings might explain the fact that in these animals, which express lower GRK2 levels, over-activation of these pathways promotes the development of a compensated heart hypertrophy.

Índice

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1. SEÑALIZACIÓN CELULAR.....	3
2. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCR).....	3
2.1. Mecanismo de acción.....	3
2.2. Regulación.....	5
3. QUINASAS DE GPCRs (GRKs).....	6
3.1. Tipos.....	6
3.2. Estructura.....	7
3.3. Mecanismo de acción.....	7
3.4. Regulación.....	8
3.4.1. Regulación de la actividad y localización subcelular de las GRKs.....	9
3.4.2. Regulación de la expresión de las GRKs.....	10
3.5. Funciones biológicas e implicaciones patológicas de GRK2 y GRK5.....	10
3.5.1. Desarrollo embrionario.....	10
3.5.2. Inflamación.....	11
3.5.3. Cáncer.....	11
3.5.4. Diabetes.....	11
3.5.5. Función cardiovascular.....	12
4. PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs).....	13
4.1. Tipos.....	13
4.2. Mecanismos de activación e inactivación.....	13
4.2.1. Módulo ERK1/2.....	14
4.2.2. Módulo p38.....	14
4.3. Dianas moleculares y localización subcelular.....	15
4.3.1. ERK.....	15
4.3.2. p38.....	15
4.4. Regulación.....	15
4.4.1. Especificidad en las interacciones.....	15
4.4.2. Fiabilidad y versatilidad de la señal.....	15
4.5. Funciones biológicas e implicaciones patológicas de ERK1/2 y p38.....	16
4.5.1. Diferenciación y desarrollo.....	16
4.5.2. Sistema inmune.....	16
4.5.3. Sistema nervioso.....	16
4.5.4. Proliferación y cáncer.....	16
4.5.5. Función cardiovascular.....	18
5. FUNCIÓN Y PATOLOGÍA CARDÍACAS.....	19
5.1. Hipertrofia cardíaca.....	19
5.2. Implicaciones de los GPCRs en la función cardíaca.....	22
5.3. Programa génico fetal.....	23
5.4. La vía de la insulina en la función cardíaca.....	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES y MÉTODOS.....	26
1. REACTIVOS.....	26
2. ÁCIDOS NUCLEICOS.....	26
2.1. Plásmidos y construcciones.....	26
2.1.1. GRKs.....	26
2.1.2. Ga.....	26

2.1.3. MKK6 y p38.....	26
2.1.4. Otros.....	26
2.2. Generación de mutantes.....	27
2.3. RNA.....	27
2.3.1. Extracción de RNA.....	27
2.3.2. RT-PCR.....	27
2.3.3. Microarrays.....	28
3. CULTIVOS CELULARES.....	28
3.1. Líneas celulares.....	28
3.2. Transfecciones.....	29
3.3. Tratamientos celulares.....	29
3.4. Diferenciación de adipocitos.....	29
3.5. Lisis celular.....	30
4. MUESTRAS DE PACIENTES.....	30
5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	31
6. ELECTROFORESIS.....	31
7. ANTICUERPOS.....	31
7.1. Anticuerpos comerciales.....	31
7.2. Generación de fosfoanticuerpos policlonales anti P-T123 p38.....	31
7.2.1. Fosfoanticuerpo de Pacific Immunology.....	31
7.2.2. Fosfoanticuerpos policlonales de conejo (sueros 462-469).....	31
7.3. Fosfoanticuerpos recombinantes producidos por AbD Serotec.....	36
7.4. Fosfoanticuerpos monoclonales producidos por Biogenes.....	37
8. INMUNOPROTOCOLOS.....	37
8.1. Inmunodetección tras electroforesis (western-blot).....	37
8.2. Inmunoprecipitación.....	37
8.3. Ensayo de sedimentación (pull down).....	38
8.4. Inmunofluorescencia.....	38
8.5. ELISA sobre péptidos.....	38
9. FOSFORILACIÓN IN VITRO.....	38
9.1. Fosforilación de p38 por GRK2.....	38
9.2. Fosforilación de p38 por MKK6.....	39
9.3. Fosforilación de ERK por MEK1.....	39
10. ENSAYOS LUCIFERASA (activación del Elemento de Respuesta a Suero –SRE-).....	39
11. ENSAYOS DE FORMACIÓN DE FIBRAS DE ESTRÉS.....	40
12. ENSAYOS EN ANIMALES.....	40
12.1. Obtención y procesamiento de macrófagos peritoneales murinos.....	40
12.2. Obtención y procesamiento de tejidos.....	41
12.3. Estudio de los parámetros morfométricos del corazón.....	41
12.4. Análisis del grosor de los cardiomiocitos.....	42
12.5. Cuantificación de la fibrosis en cortes de corazón.....	42
12.6. Efecto de la edad.....	42
12.7. Tratamiento de los ratones con Insulina.....	42
12.8. Estudio ecocardiográfico.....	42
12.9. Estudio de la presión arterial.....	42
12.10. Test de tolerancia a glucosa e insulina.....	42

13. TRATAMIENTO MATEMÁTICO Y ESTADÍSTICO.....	43
14. JUSTIFICACION DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS.....	43
14.1. Interacciones funcionales entre GRKs y MAPKs.....	43
14.1.1. Regulación de Gα12 por GRK5 de manera dependiente de ERK.....	43
14.1.2. Regulación de p38 por GRK2.....	43
14.1.2.1. Macrófagos peritoneales.....	43
14.1.2.2. Diferenciación de células preadipocíticas 3T3L1 a adipocitos...	43
14.1.2.3. Otros tipos celulares.....	43
14.1.3. Regulación de ERK por GRK2.....	44
14.2. Efecto de la disminución en los niveles/actividad de GRK2 en la función cardíaca ..	44
RESULTADOS.....	45
1. INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE GRKs Y MAPK.....	45
1.1. Regulación de Gα12 por GRK5 de manera dependiente de ERK.....	45
1.1.1. Influencia del estado de activación de Gα12/13 en su interacción con GRK5.....	45
1.1.2. Influencia de la interacción entre GRK5 y Gα12 en respuestas celulares mediadas por G12.....	46
1.1.3. Implicación del dominio RH de GRK5 e influencia de la fosforilación de GRK5 por ERK sobre su interacción con Gα12.....	47
1.2. Regulación de p38 por GRK2.....	49
1.2.1. Los niveles de activación de p38 correlacionan inversamente con su fosforilación en el residuo T123.....	49
1.2.2. La diferenciación de células adipocíticas y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por macrófagos son procesos celulares dependientes de p38 que pueden ser regulados por los niveles de GRK2.....	51
1.2.3. Caracterización de nuevos fosfo-anticuerpos generados contra P-T123 p38 para intentar mejorar la inmunodetección.....	51
1.2.4. Búsqueda de procesos celulares o tejidos en los que se detecte la fosforilación de p38 por GRK2.....	54
1.3. Regulación de la ruta de MEK-ERK por GRK2.....	58
1.3.1. La regulación de la ruta MEK/ERK por GRK2 es independiente de su actividad quinasa.....	58
1.3.2. Estudio molecular de la regulación de la ruta MEK/ERK por GRK2.....	59
2. EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE GRK2 EN LA FUNCIÓN CARDÍACA.....	63
2.1. Estudio del efecto de GRK2 en la función cardíaca en el proceso de envejecimiento..	63
2.1.1. Estudio morfométrico del tejido cardíaco.....	63
2.1.2. Estudio ecocardiográfico del tejido cardíaco.....	66
2.1.3. Estudio de la presión arterial de animales WT y GRK2+/- durante el proceso de envejecimiento.....	67
2.1.4. Análisis del estado de activación de diferentes vías de señalización intracelular implicadas en hipertrofia cardíaca.....	68
2.1.4.1. GRKs.....	68
2.1.4.2. p38 y Akt.....	70
2.1.4.3. MEK1/ERK1-2.....	70
2.1.5. Estudio de cambios en la expresión génica en ratones GRK2+/+ y GRK2+/- con la edad.....	71
2.1.5.1. Análisis de los cambios en la expresión génica en corazón de ratones GRK2+/+ y GRK2+/- con la edad.....	71
2.1.5.2. Análisis mediante RT-PCR de parámetros importantes en corazón de ratones WT y GRK2+/-.....	77
2.2. Papel de GRK2 en la regulación de la señalización por insulina.....	80

DISCUSIÓN.....	83
1. INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE GRKs Y MAPK.....	83
1.1. GRK5 y ERK.....	83
1.2. GRK2 y p38.....	85
1.2.1. Secreción de citoquinas inflamatorias.....	85
1.2.2. Diferenciación.....	86
1.2.3. Otros contextos fisio-patológicos.....	86
1.3. GRK2 y ERK.....	88
2. IMPACTO IN VIVO DE CAMBIOS EN LOS NIVELES DE GRK2.....	90
2.1. Influencia de los niveles de GRK2 en la reprogramación génica cardíaca.....	90
2.2. Influencia de GRK2 en la señalización celular y desarrollo de hipertrofia cardíaca..	91
2.3. Modelo propuesto.....	94
CONCLUSIONES.....	98
BIBLIOGRAFÍA.....	99

α -, β 1- y β 2-AR: Receptores alfa, beta 1 y beta 2 adrenérgicos.
 β -arr: β -arrestinas.
aa: Aminoácidos.
AC: Adenilato ciclasa.
AMPC: Adenosín monofosfato cíclico.
ANP: Péptido natriurético del atrio.
APS: Persulfato amónico.
ADP/ATP: Adenosina di/tri-fosfato.
ATF-2: Factor activador de la transcripción 2.
BSA: Albúmina de suero bovino.
Cdc42: GTPasa monomérica.
CFA: Adyuvante Completo de Freund.
COIPP: Coinmunoprecipitación.
DAG: Diacilglicerol.
DAG-HRP: Anticuerpo secundario anti-cabra generado en burro (del inglés "Donkey Anti-Goat") acoplado a peroxidasa.
DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO: Dimetilsulfóxido.
DNA: Ácido desoxirribonucleico.
DABCO: 1,4-diaza-biciclo-octano, empleado como medio de montaje en microscopía de fluorescencia.
Dominios SH2: Dominios de homología a Src de tipo 2.
Dominios RH: Dominios de homología a RGS.
DTT: Ditiotritol.
EDTA: Ácido etilén-diamino-tetraacético.
ELISA: Inmunoensayo ligado a enzima (del inglés "Enzyme Linked Immunoassay").
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
EGTA: Ácido etilenglicol-bis- β -amino etil N, N' tetraacético.
ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares.
FBS: Suero fetal bovino.
FITC: Isotiocianato de fluoresceína, fluoróforo usado en microscopía.
G α : Subunidad alfa de las proteínas G.
G $\beta\gamma$: Subunidades beta-gamma de las proteínas G.
GAP: Proteína estimuladora de la actividad GTPasa.
GAH: Anticuerpo secundario anti-humano generado en cabra (del inglés "Goat Anti-Human").
GAM: Anticuerpo secundario anti-ratón generado en cabra (del inglés "Goat Anti-Mouse").
GAR: Anticuerpo secundario anti-conejo generado en cabra (del inglés "Goat Anti-Rabbit").

GDP/GTP: Guanosina 5' di/tri-fosfato.
GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina.
Gly: Glicina.
GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G.
GRKs: Quinasas de receptores acoplados a proteínas G.
GSK: Quinasa de glicógeno sintasa.
GST: Glutathión S-transferasa.
GTPasa: Actividad de hidrólisis del GTP.
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinoetanosulfónico.
HRP: peroxidasa de rábano (del inglés "Horseradish Peroxidase").
IP: Inmunoprecipitación.
IP₃: Inositol trifosfato.
Iso: Isoproterenol (agonista de receptores adrenérgicos).
IFA: Adyuvante Incompleto de Freund.
JNKs: Quinasas del extremo N-terminal de c-Jun.
K.O.: ratones deficientes para un gen dado (del inglés "Knockout").
KDa: Kilo Dalton.
LPA: Ácido Lisofosfatídico.
LPS: Lipopolisacárido bacteriano.
MAPKs: Quinasas activadas por mitógenos.
MAPKKs: Quinasas de las MAPK. También llamadas MEKs o MKKs.
MAPKKKs: Quinasas de las MAPKK.
MDM2: Del inglés "MURINE DOUBLE MINUTE 2", regulador de p53.
MEF2A: Factor potenciador de miocitos 2A.
MKK6CAM: MKK6 constitutivamente activa.
mRNA: RNA mensajero.
NCS: suero bovino neonatal.
NFAT: Factor nuclear de células T activadas.
ONPG: O-Nitrofenil β -D-dalacto piranósido.
OPD: Orto-fenil diamina.
p38: Quinasa de respuesta a estrés y citoquinas inflamatorias.
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS: Tampón fosfato salino.
PDE: Fosfodiesterasa.
PFA: Paraformaldehído.
PH: Dominio de homología a plectrina.
Pha: Faloidina, toxina obtenida de *Amanita phalloides* que une F-actina polimérica.
Pi: Fosfato inorgánico.
PI3K: 3'OH quinasa de fosfatidil inositoles.

PIP₂: Fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato.
PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc.
PKC: Proteína quinasa C.
PLC: Fosfolipasa C.
PMSF: Fenil metilsulfonil fluoruro.
Raf1: MAPKKK de la vía de ERK.
Ras: GTPasa monomérica.
RE: Retículo endoplásmico.
RGS: Regulador de la señal de proteínas G.
Rho: GTPasa monomérica.
RNA: Ácido ribonucleico.
RTKs: receptores con actividad tirosina quinasa.
SDS: Dodecil sulfato sódico.
SEM: Error estándar de la media.
Ser: Serina.
si-RNA: RNA pequeño de interferencia.
Src: Tirosina quinasa citosólica.

SRE: Elemento de respuesta a suero.
SRF: Factor de respuesta a suero.
TAG: Secuencia de aminoácidos usada como epítipo ("etiqueta molecular").
TEMED: N, N, N', N'-tetrametil-etilén-diamina.
TGF-β: Factor de crecimiento transformante β.
Thr: Treonina.
TNFα: Factor de necrosis tumoral α.
Tris: Tris-hidroxi-metil-amino-metano.
TRITC: Isotiocianato de tetrametil rodamina, fluoróforo usado en microscopía.
TCR: Receptor de las células T.
Tyr: Tirosina.
WB: western blot o inmunodetección.
WT: de genotipo silvestre (del inglés "wild type").

Introducción

1. SEÑALIZACIÓN CELULAR

Los organismos pluricelulares, a pesar de que pueden percibirse como una unidad funcional, están formados por multitud de células que llevan a cabo cometidos muy diversos. Para que el organismo funcione en conjunto, nuestras células necesitan **interpretar la multitud de señales** que reciben del ambiente que les rodea para coordinar su comportamiento.

Los mecanismos por los que una célula responde a estímulos extracelulares y se comunica con otras células de su alrededor implican una serie de **vías de transducción** de señales, que integran una gran cantidad de proteínas.

La base de la comunicación celular consiste en la unión de un receptor a su ligando, lo que desencadena una serie de eventos intracelulares que darán lugar a una respuesta celular determinada. La complejidad de la comunicación celular es enorme, al expresar las células distintos receptores en su membrana, además de coexistir dentro de la célula numerosas vías de transducción de señales que interaccionan entre sí, lo que permite la integración de toda la información que recibe del medio de manera específica para emitir una respuesta.

Algunos componentes de las cascadas de señalización están muy conservados en la evolución y regulan muchos procesos fisiológicos. Entre estas moléculas queremos destacar los receptores acoplados a proteínas G, las quinasas de estos receptores y las quinasas activadas por mitógenos.

2. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCR)

Los receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs) constituyen la familia más numerosa de proteínas transmembrana de vertebrados, con alrededor de mil miembros. **Reconocen** hormonas, neurotransmisores, citoquinas, iones, factores autocrinos y paracrinos, así como aromas e incluso fotones, regulando un elevado número de procesos biológicos, que incluyen el control de básicamente

todas las funciones fisiológicas, entre ellas la neurotransmisión sináptica, la percepción del dolor, la luz, sabores y olores, la atracción de células por quimiotaxis, la regulación de la mitosis, además de mediar el efecto de numerosos agentes terapéuticos.

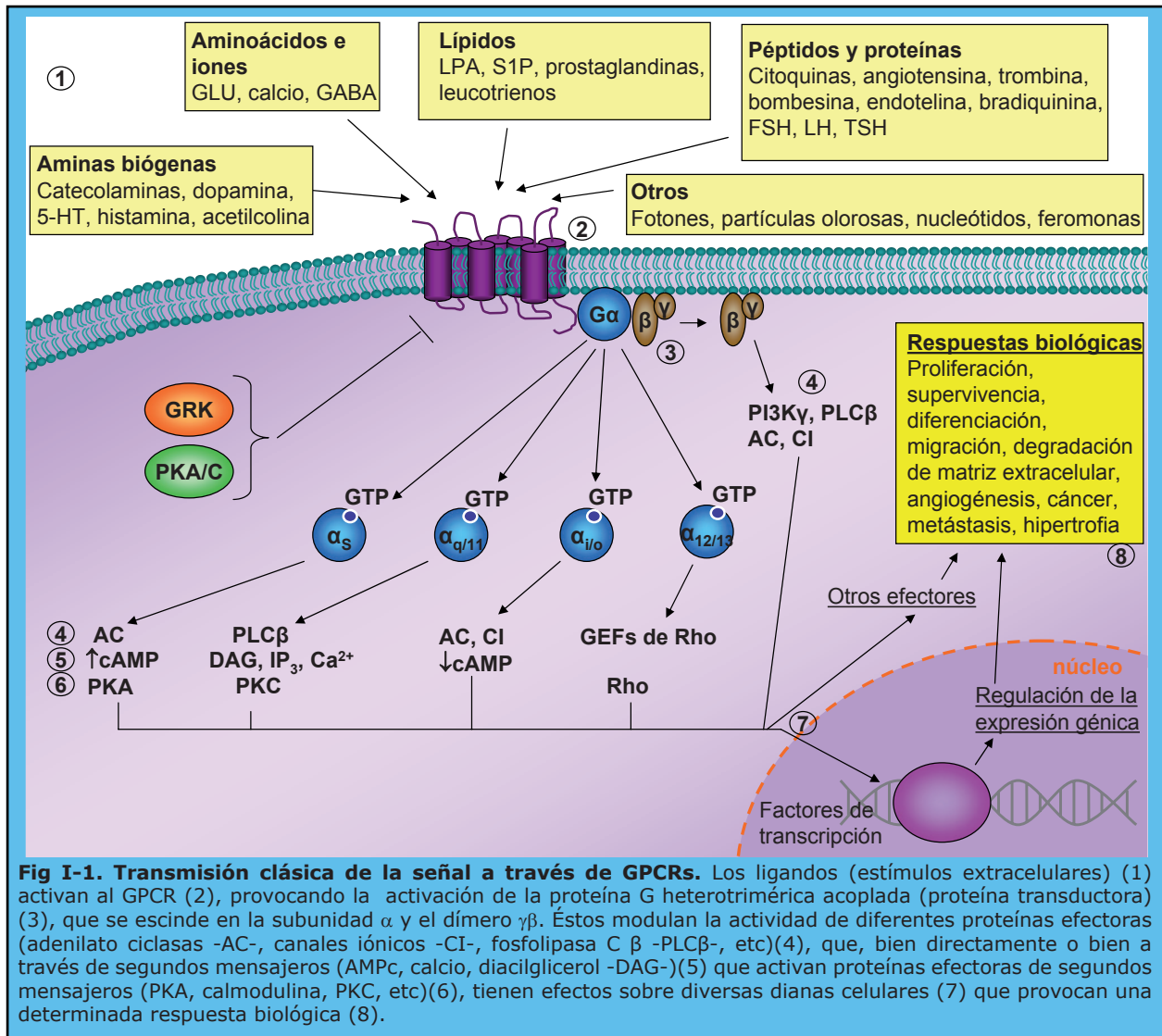
Dado este gran abanico de funciones biológicas, no sorprende su **implicación en patologías** tan importantes como las enfermedades cardiovasculares (Dorn 2009; Brinks et al. 2010), o la progresión tumoral y metástasis (Dorsam et al. 2007; Spiegelberg et al. 2007). De hecho, los GPCRs son diana del 50% de los medicamentos comercializados en la actualidad, constituyendo la principal familia de proteínas utilizadas como diana terapéutica (Lefkowitz 2000; Pierce et al. 2002; Kang et al. 2007; Ritter et al. 2009). Además, ciertas variaciones genéticas localizadas en estos receptores, o desequilibrios en la amplia maquinaria que los regula, se relacionan con enfermedades de gran importancia como las cardiovasculares, las de etiología inmune o ciertos trastornos neurológicos (Thompson et al. 2005; Thompson et al. 2008).

2.1. Mecanismo de acción

Los GPCRs poseen una estructura común con siete dominios transmembrana (7TM). El término GPCR es una definición funcional más que estructural, ya que la mayoría de ellos transmite señales, entre otros mecanismos más recientemente descubiertos, mediante la activación de proteínas G heterotriméricas (Landry et al. 2006).

La transmisión clásica de la señal por un GPCR (**figura I-1**) comenzaría cuando un ligando se une a la región extracelular y/o transmembrana del receptor y se produce un cambio conformacional en sus α -hélices transmembrana (Sealfon 2005) que se transmite a los dominios intracelulares, provocando la activación de la proteína G heterotrimérica acoplada que está anclada a la membrana plasmática y consta de tres subunidades: α , β y γ , agrupadas éstas dos últimas en dímeros $\beta\gamma$.

La subunidad α es activa mientras está unida a GTP, e inactiva mientras está unida a GDP. Este ciclo está modulado por varias proteínas: las proteínas reguladores de la señal de proteínas G (proteínas RGS) estimulan la actividad GTPásica, los factores



de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) disminuyen su afinidad por el GDP, y los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs) estabilizan la forma unida a GDP (Hamm et al. 2004). El GPCR actúa como un GEF, catalizando el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α , lo que induce la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$ entre sí y del receptor.

Se han descrito cuatro familias de proteínas G según el tipo de subunidad α : α_s , $\alpha_{i/o}$, $\alpha_{q/11}$ y $\alpha_{12/13}$ (Neer 1995) con las funciones principales que se detallan a continuación. **G α_s** acopla los GPCRs a adenilato ciclasas, mediando su activación y consecuente incremento en la concentración de cAMP intracelular. En cambio, los principales miembros de la familia **G $\alpha_{i/o}$** median la inhibición de varios tipos de adenilato ciclasas. La familia **G $\alpha_{q/11}$** acopla los receptores a la proteína fosfolipasa C β (PLC β) (Worzel

et al. 2008). Por último, las proteínas de la familia **G $\alpha_{12/13}$** median la activación de GEFs específicos de Rho, que regulan la actividad de esta GTPasa monomérica implicada fundamentalmente en procesos de control del citoesqueleto celular a través de la activación de Rock (quinasa de Rho) y al factor de respuesta a suero (SRF) (Anliker et al. 2004). Así, la activación de **G α_{12}** media la reorganización del citoesqueleto de actina, la adhesión célula-célula y el control de programas génicos que regulan proliferación y transformación oncogénica (Jaffe et al. 2005; Meigs et al. 2005; Suzuki et al. 2009). Por otro lado, el dímero **$\beta\gamma$** regula varios enzimas (como PLC β) y canales iónicos, y también puede interaccionar con GEFs de Rac1 y Cdc42 para mediar su activación (Ueda et al. 2008).

Estos efectores modulan a su vez a otras moléculas, bien directamente o bien mediante

la generación de segundos mensajeros (cAMP, diacilglicerol, inositol-1,4,5-trifosfato), que repercuten en la función de proteínas quinasas como PKA y PKC (Pierce et al. 2002; Ritter et al. 2009).

La actividad GTPasa de la subunidad α actúa como cronómetro molecular, de forma que al hidrolizarse el GTP la señal finaliza y se regenera el heterotrímero (Hamm et al. 2004).

2.2. Regulación

Para una respuesta específica y finamente controlada, son necesarios mecanismos complejos de regulación. Una rápida amortiguación de la función de los GPCRs se consigue por **fosforilación del receptor**. La fosforilación del receptor por quinasas activadas por segundos mensajeros (PKA o PKC) desacopla el receptor de su proteína G. La activación de estas quinasas por un tipo de receptor puede llevar a la fosforilación y desensibilización de otro, fenómeno conocido como desensibilización heteróloga. En cambio, las quinasas de GPCRs (GRKs) median desensibilización homóloga de los GPCRs fosforilando únicamente aquellos

GPCRs unidos a agonista (Pierce et al. 2002).

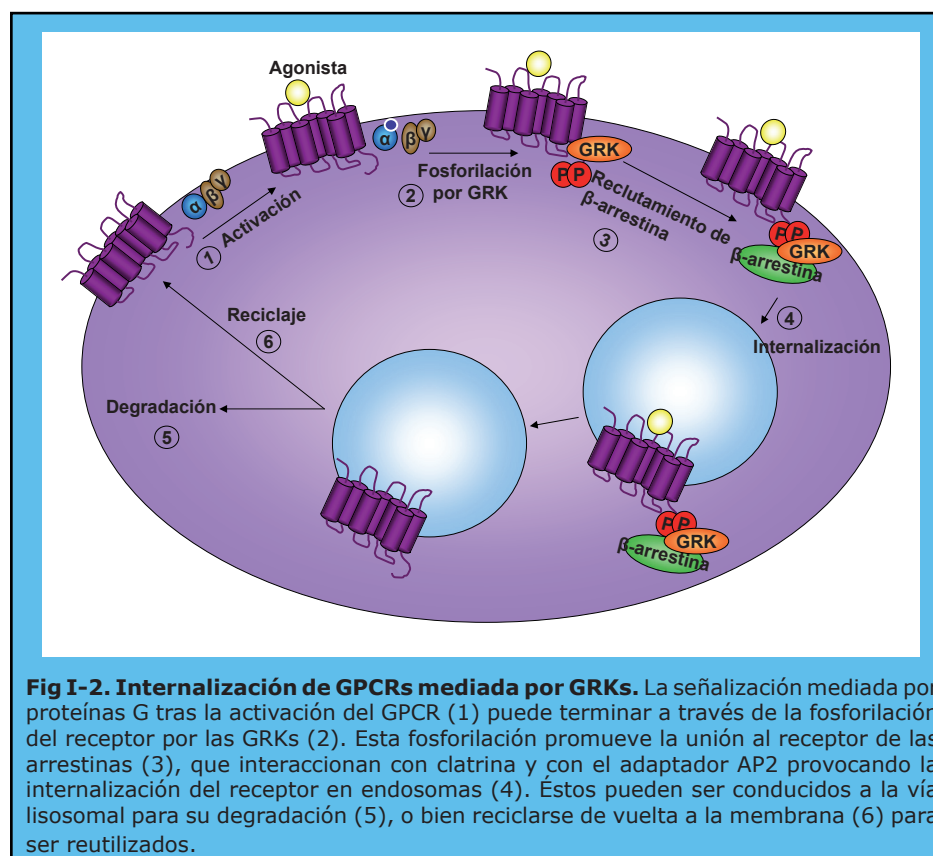
Esa conformación del receptor es capaz de reclutar y activar a las GRKs, que fosforilan al receptor, lo que recluta a su vez a unas proteínas denominadas β -arrestinas, que desacoplan al GPCR de la proteína G y dirigen al receptor fosforilado hacia vesículas recubiertas de clatrina promoviendo su **internalización (figura I-2)**. El GPCR puede entonces ser conducido a la vía lisosomal, donde es degradado, o a endosomas de reciclaje para ser defosforilado y retornar a la superficie celular en el proceso funcional de resensibilización de receptores (Ritter et al. 2009).

La señalización mediada por los GPCRs es muy versátil en parte gracias a que cuenta con esta estructura modular de varios componentes: receptores, proteínas G y efectores, además de múltiples proteínas reguladoras (Worzel et al. 2008). Además, la respuesta celular puede estar modulada por el entorno molecular, el tipo celular, la situación fisiológica o patofisiológica, y el tipo de receptor que reconoce al ligando (Pierce et al. 2002; Ritter et al. 2009).

Por ello, la señalización por GPCRs es altamente dependiente del contexto

biológico, de manera que las respuestas son específicas de cada tejido aun cuando se exprese en ellos el mismo subtipo de receptor (Eglen 2005). Esto es debido, en muchos casos, a las diferencias en la expresión, en los distintos tipos celulares, de ciertas proteínas que interaccionan y regulan la actividad de los GPCRs, además de las proteínas G, GRKs, arrestinas y otros receptores (Ritter et al. 2009).

Además, se ha demostrado que un mismo receptor puede tener la capacidad



de acoplarse a múltiples proteínas G, a otras proteínas adaptadoras de manera independiente de proteínas G, adoptar múltiples conformaciones, sufrir diferentes modificaciones post-traduccionales y regularse mediante agrupamientos en microdominios de la membrana (Defea 2008; Ritter et al. 2009).

3. QUINASAS DE GPCRs (GRKs)

3.1. Tipos

Las GRKs están codificadas por una pequeña familia de siete genes en mamíferos (Pierce et al. 2002). Se distribuyen en tres subfamilias:

-Subfamilia de quinasas de rodopsina o GRKs visuales: GRK1 y GRK7, presentes en conos y bastones de la retina.

-Subfamilia de quinasas del receptor β -adrenérgico (anteriormente denominadas β ARK): GRK2 y GRK3, ubicuas en mamíferos. La expresión de GRK2 es mayor en cerebro, linfocitos, corazón y bazo, seguidos por el pulmón y el riñón (Sterne-Marr et al. 1995).

-Subfamilia GRK4: GRK4, GRK5 y GRK6. GRK4 está presente sólo en testículos, cerebelo y riñón (revisado en (Ribas et al. 2007)). GRK5 se expresa principalmente en corazón, pulmón y retina, y está ausente o en bajas cantidades en cerebro, hígado y riñón (Premont et al. 1995).

Así, un pequeño número de GRKs regula la sensibilidad de un elevado número de GPCRs. Aunque puede haber redundancia funcional entre estas quinasas, parece que distintas GRKs, al actuar sobre un mismo receptor, pueden fosforilar sitios distintos y desembocar en diferentes consecuencias funcionales. Por otro lado, la distribución tisular concreta de cada isoforma de GRKs

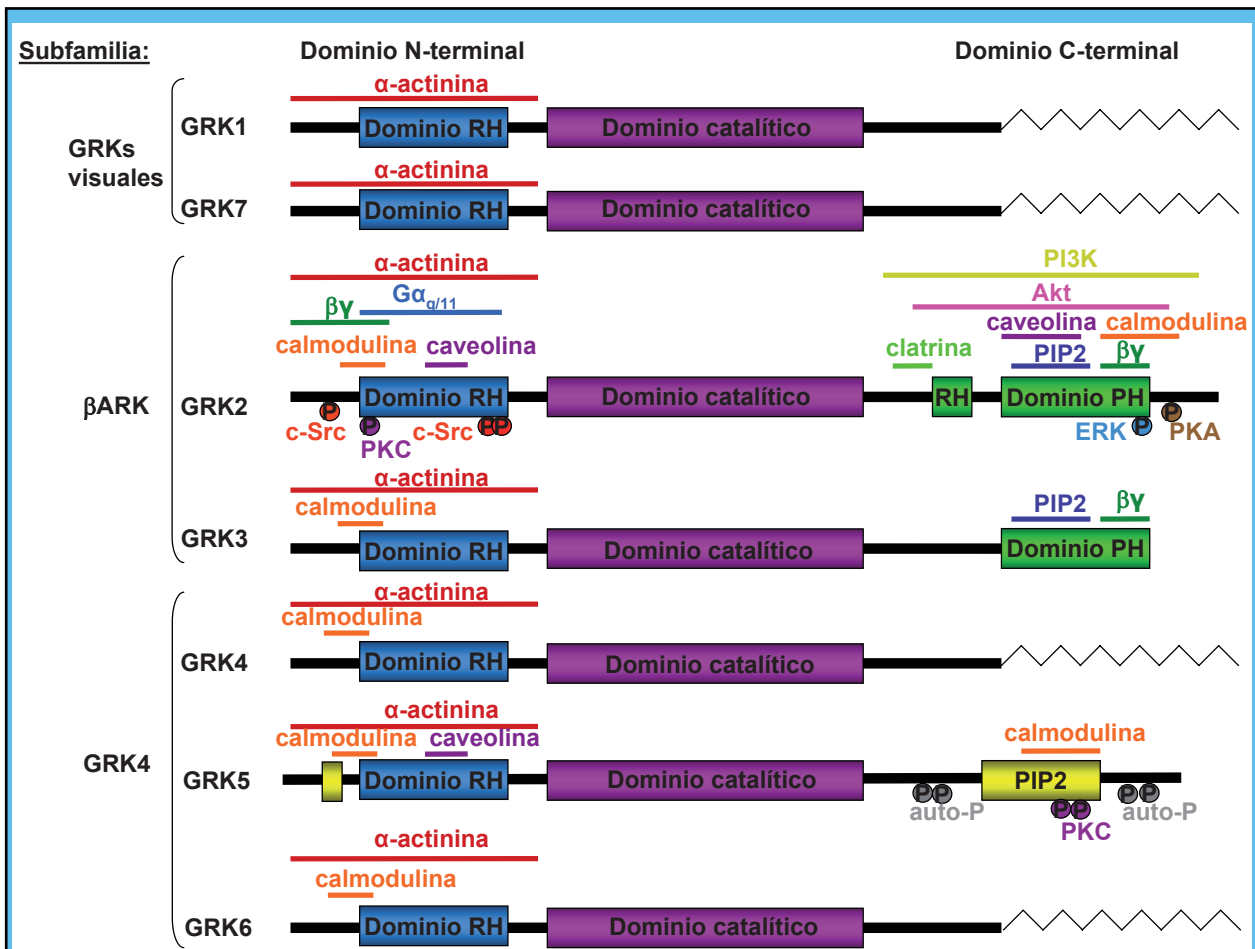


Fig I-3. Estructura de las GRKs. Las siete GRKs descritas tienen una estructura común multidominio. Sin embargo, existen algunas diferencias entre ellas, y además estas quinasas son moduladas diferencialmente en la célula. Se indican las regiones de interacción y los sitios de fosforilación implicados en su modulación. GRK2 y GRK5 son las GRKs mejor caracterizadas.

y sus niveles de expresión y actividad contribuyen a su especificidad *in vivo* (Penela et al. 2003).

3.2. Estructura

Las GRKs comparten una arquitectura estructural multidominio (**figura I-3**). En primer lugar, presentan un **dominio catalítico central** muy conservado, homólogo al de otras serín-treonín-quinzas de la familia AGC. En segundo lugar, el **dominio C-terminal** contiene determinantes de localización subcelular y/o translocación a la membrana dependiente de agonista, ya que permite la interacción de las GRKs con lípidos y otras proteínas de membrana. GRK2 y GRK3 contienen en esta región un dominio de homología a plekstrina (PH) por el que interaccionan con los fosfolípidos de membrana PIP_2 y con el dímero $\beta\gamma$, que permite su translocación a la membrana tras la estimulación del GPCR, ya que GRK2 y GRK3 son proteínas mayoritariamente citoplasmáticas. GRK4 y 6 son palmitoiladas post-traduccionamente, de modo que se asocian de manera constitutiva a membrana. GRK5 también está constitutivamente asociada a la membrana a través de un dominio de unión a PIP_2 en su región N-terminal y otro en su región C-terminal. Además, la región C-terminal contiene una hélice anfipática de unión a membrana. GRK1 y 7 están constitutivamente localizados en membrana por farnesilación post-traducciona en su región C-terminal. En tercer lugar, las GRKs presentan un **dominio N-terminal** que determina el reconocimiento del receptor, su activación alostérica, y también regula el anclaje intracelular de la GRK a localizaciones subcelulares concretas. Este dominio contiene una región RH (de homología a RGS), a través de la cual las GRKs podrían interaccionar con las proteínas G, además de otros motivos implicados en la regulación

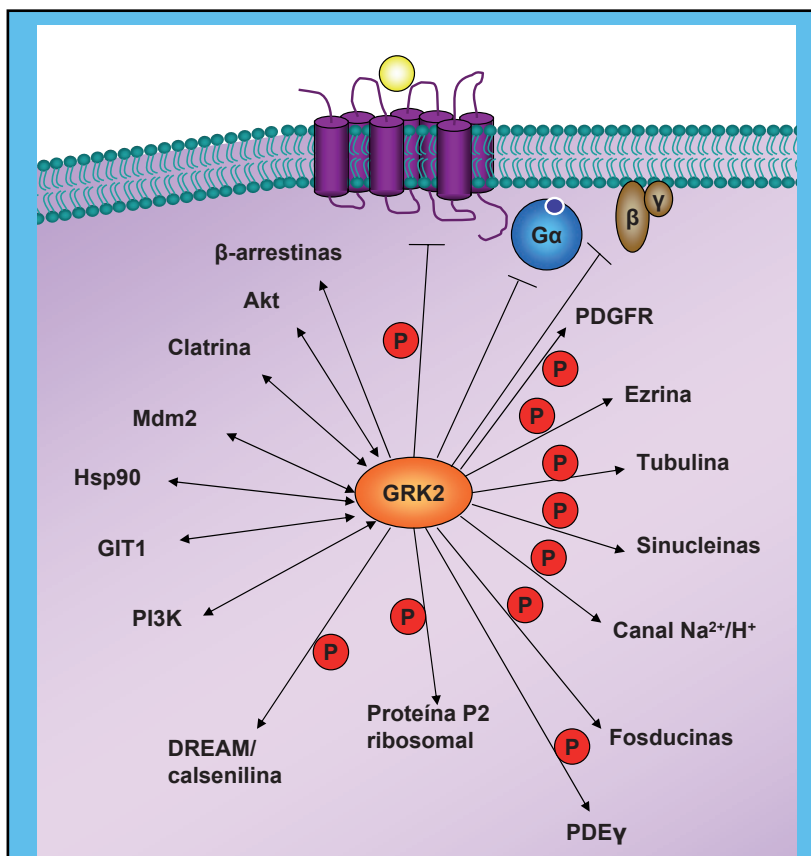


Fig I-4. Interacciones funcionales de GRK2. Además de la fosforilación de los GPCRs, se han descrito numerosas interacciones funcionales de GRK2 con otras proteínas, en las que puede estar implicada su actividad quinasa (P) o bien tener lugar de manera independiente de actividad quinasa (\leftrightarrow) (ver texto).

de la quinasa, como es el caso de GRK2 que muestra también en su zona N-terminal un sitio de unión a $\beta\gamma$ (Premont et al. 1995; Penela et al. 2003).

Además, las GRKs presentan **diversos sitios de fosforilación** para diferentes quinzas, que modulan su localización, actividad y estabilidad (Pitcher et al. 1998; Penela et al. 2003; Ribas et al. 2007).

3.3. Mecanismo de acción

Las GRKs se describieron como proteínas que finalizan la señalización de los GPCRs a ciertas rutas intracelulares mediante fosforilación del receptor, favoreciendo el reclutamiento de las arrestinas. Sin embargo, más recientemente se ha descubierto que estas quinzas **tienen funciones adicionales** (**figura I-4**).

En primer lugar, las GRKs pueden regular la señalización de GPCR de manera independiente de fosforilación, como es el caso de GRK2, que se une selectivamente

a $G_{q/11}$, bloqueando la activación de PLC β mediada por esta proteína G. Por ello, tanto GRK2 como su mutante sin actividad quinasa suprimen la actividad de PLC tras la activación de los receptores α_{1B} -adrenérgicos o los receptores de endotelina ET $_A$ y ET $_B$ (revisado en Willets et al. 2003).

En segundo lugar las GRKs pueden activar la señalización de GPCR de manera independiente de proteínas G (Rajagopal et al. 2005). Tanto las GRKs como las arrestinas reclutadas por ellas pueden servir de anclaje entre el receptor y otras proteínas para que la señalización continúe por otras vías de transducción (Lefkowitz et al. 2005; Shenoy et al. 2005; Ritter et al. 2009). Así, tras la activación de algunos receptores como el receptor de angiotensina AT $_{1A}$ R, las β -arrestinas funcionan como andamiaje para los componentes de la cascada de MAPK (que se describirá más adelante), conduciendo a la activación de ERK (Luttrell et al. 2001). Para muchos receptores, la activación mediada por las β -arrestinas es más lenta y persistente, y ERK activa queda secuestrada en el citosol de la célula; ERK activada por la vía de las proteínas G se activa rápida y transitoriamente y se transloca al núcleo, donde estimula la transcripción y conduce a proliferación. Las β -arrestinas pueden también mediar la activación de ERK a través de su interacción con el proto-oncogen c-Src y pueden funcionar como proteínas andamio para otros módulos de cascadas de MAPK como JNK, mediar la activación de p38 vía el receptor de quimioquinas CXCR4, funcionar de andamiaje para Akt y su regulador negativo PP2A tras estimulación dopaminérgica, o mediar la formación de fibras de estrés tras la activación del receptor de angiotensina AT $_{1A}$ R (Reiter et al. 2006).

El interactoma de las GRKs es también complejo. Estas quinasas pueden facilitar el reclutamiento de distintos componentes de varias vías de transducción a localizaciones subcelulares específicas (Elorza et al. 2003; Luttrell 2003; Penela et al. 2003; Ribas et al. 2007). Las GRKs son capaces de interactuar con proteínas en muy distintas localizaciones subcelulares, entre las que se encuentran, además de las proteínas G y GPCRs, Hsp90, calmodulina, clatrina, caveolina o RKIP. Entre las proteínas señalizadoras que interactúan con GRKs, cabe destacar PI3K, que es así reclutada a complejos con el GPCR activado, y la serín-treonín quinasa Akt, provocando su inhibición. GRK2, 3, 5 y 6 pueden

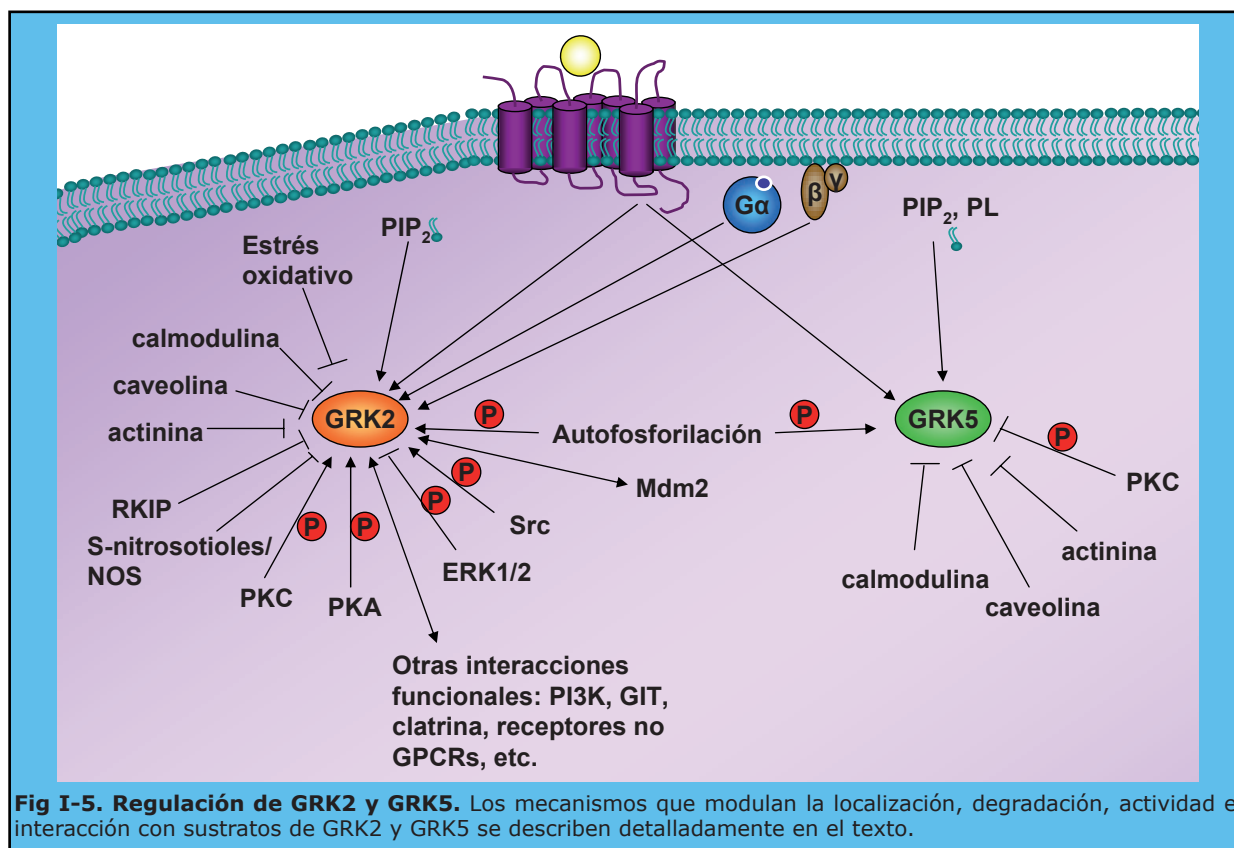
interaccionar también con las proteínas GIT, que se unen a su vez a una gran variedad de moléculas señalizadoras y están implicadas en múltiples procesos celulares, como el control de la dinámica del citoesqueleto, tráfico de vesículas, y adhesión celular (Ribas et al. 2007).

Además, las GRKs pueden fosforilar otros receptores no GPCR, como el receptor de PDGF, y sustratos como tubulina, sinucleinas, fosducina, la proteína ribosomal P2, la subunidad γ inhibitoria de la fosfodiesterasa de cGMP retinal tipo 6, la subunidad β del canal de Na $^+$ epitelial, ezrina y otros sustratos solubles (revisado en Ribas et al. 2007).

Resulta interesante que las diferentes isoformas de GRKs ejerzan funciones especializadas y a veces antagónicas sobre la activación de una vía de señalización. Así, GRK2 media la fosforilación del receptor de AngiotensinaII, el posterior reclutamiento de β -arrestinas y la endocitosis del receptor, lo que disminuye la señalización a través de él y por tanto la activación de ERK dependiente de proteínas G en células HEK293. Sin embargo, en este mismo modelo, GRK5 potencia la activación de ERK mediada por β -arrestina (Kim et al. 2005). El mismo efecto de inhibición de la activación de ERK por GRK2/3 y potenciación por GRK5/6 es observado en respuesta a vasopresina (Ren et al. 2005) desvelando así que existe una disparidad funcional entre distintas GRKs aunque éstas sean muy similares en secuencia y estructura.

3.4. Regulación

Se han descrito **interacciones intra-moleculares reguladoras** entre el dominio N-terminal, C-terminal y el dominio catalítico de GRK2, confirmadas por la estructura del cristal de GRK2 (Lodowski et al. 2003), que han llevado a proponer un modelo según el cual la disrupción de estos contactos promueve cambios conformacionales que conducen a su translocación y activación (Sarnago et al. 2003). Muy recientemente se ha descrito que existe una activación alostérica de GRK2 basada en interacciones intramoleculares de varios de sus dominios (Baameur et al. 2009) y, más en particular, de su dominio N-terminal (Pao et al. 2009). Los residuos implicados en este tipo de regulación han sido identificados (Huang et



al. 2009).

Hasta la fecha no existen **inhibidores específicos** individuales de las GRKs. Experimentalmente se emplean heparina, Zn^{2+} y suramina como inhibidores no selectivos dirigidos al sitio de unión a ATP (Willets et al. 2003), y se han descrito otros inhibidores más (beta-ARK1, GF109203X, y Ro32-0432) que, aunque muestran cierta selectividad por GRKs, inhiben además otras quinasas. Además, se han generado algunos péptidos derivados del primer bucle intracelular del receptor β 2-adrenérgico (Winstel et al. 2005), y otros derivados de la propia secuencia de GRK2 que muestran cierta especificidad (Anis et al. 2004; Baameur et al. 2009; Barthet et al. 2009; Pao et al. 2009). Se ha descrito además un inhibidor *in Vitro* de tipo aptamérico para esta quinasa en base a una selección de RNAs (Mayer et al. 2008).

Fisiológicamente, la actividad de las GRKs se modula mediante **interacciones** con diversas moléculas y proteínas, así como **por fosforilación** mediada por diferentes quinasas (ver **figuras I-3 y I-5**).

3.4.1. Regulación de la actividad y localización subcelular de las GRKs

GRK2 es una enzima citoplásmica que se transloca a membrana tras la activación del receptor. Además del efecto modulador positivo que los **GPCRs activados** por sus ligandos muestran sobre las GRKs, los **fosfolípidos de membrana** también regulan a estas quinasas. La fosfatidilserina estimula la actividad de GRK2, y el fosfatidil inositol 4,5 difosfato favorece la actividad catalítica y promueve la asociación a membrana de todas las GRKs. El dímero $\beta\gamma$ y la subunidad $\alpha_{q/11}$ también podrían reclutar a GRK2 a la membrana.

GRK2 puede estar presente en otros compartimentos celulares, como asociada a membranas microsomales (a través del dominio N-terminal), en zonas de la membrana plasmática ricas en **caveolina** (regiones de unión en el dominio C-t y N-t) o en vesículas endosomales. Las caveolinas se unen tanto a GRK2 como a GRK5, inhibiendo su actividad basal además de facilitar su interacción con otras moléculas señalizadoras o reguladoras.

Además las GRKs pueden interaccionar con **α -actinina**, proteína entrecruzadora de actina, que inhibe completamente su actividad.

Por otro lado, los niveles de **calcio** modulan la actividad de las GRKs mediante su interacción con proteínas sensoras de calcio. La **calmodulina** inhibe la actividad de GRK2 a altas concentraciones, mientras que a baja concentración calmodulina unida a calcio inhibe la actividad de GRK5, que es más sensible a ella. Sin embargo, la calmodulina desplaza la actina unida a GRK5, aumentando su capacidad de fosforilar sustratos solubles (Penela et al. 2003; Ribas et al. 2007). Además, la unión de Ca^{2+} -calmodulina a GRK5 media su translocación al núcleo (Martini et al. 2008).

Otra asociación que bloquea la actividad quinasa de GRK2 es su interacción con la proteína inhibidora de quinasas (**RKIP**), que es fosforilada por PKC tras la estimulación de GPCR, lo que aumenta su afinidad por GRK2 disociándola así de Raf1, lo cual prolonga la activación de ERK (Ribas et al. 2007).

GRK2 puede inhibirse también por **S-nitrosilación** promovida por S-Nitrosotioles así como por las Oxido Nítrico Sintetas (NOS) (Whalen et al. 2007).

Por otro lado, **PKC** fosforila a GRK2 potenciando su interacción con la membrana, lo que aumenta su actividad frente a receptores sin afectar a su capacidad catalítica, mientras que inhibe la actividad catalítica de GRK5. PKC fosforila a GRK2 en S29, dentro de su región de unión a calmodulina (Krasel et al. 2001), lo que sugiere que puede existir una población de GRK2 basalmente inhibida formando complejo con calmodulina, que sería liberada tras fosforilación por PKC. Por su parte, **PKA** fosforila a GRK2 en S685, incrementando su interacción con $\beta\gamma$ y así facilitando su interacción con los receptores sin afectar a su actividad catalítica, mientras que **c-Src** fosforila a GRK2 en distintas posiciones de su dominio RH, lo que resulta en cambios funcionales profundos y un aumento de su capacidad catalítica y su capacidad de interacción con $\text{G}\alpha_q$.

Por último, **ERK** fosforila a GRK2 en S670, dentro de la región de unión a $\beta\gamma$, impidiendo esta interacción activatoria y la translocación de GRK2 a la membrana (Penela et al. 2008).

3.4.2. Regulación de la expresión de las GRKs

Los niveles de expresión de las GRKs está regulados por mecanismos de control transcripcional o por mecanismos post-

transcripcionales que afectan a su estabilidad (Penela et al. 2003).

La regulación de las GRKs a nivel transcripcional no está todavía bien estudiada. Se ha descrito que en células de músculo liso de aorta determinados agentes que inducen vasoconstricción e hipertrofia aumentan la actividad del promotor de GRK2, mientras que las citoquinas proinflamatorias promueven el efecto contrario (Ramos-Ruiz et al. 2000).

En cuanto a la **degradación** de GRK2, la activación de GPCRs como el receptor adrenérgico β_2 aumenta su ubiquitinación y tasa de recambio (Penela et al. 1998). La fosforilación de GRK2 por **ERK** o por **c-Src** reclutada por β -arrestinas conduce a su ubiquitinación y degradación por la vía del proteasoma (Penela et al. 2003). Por otro lado, una ubiquitina ligasa implicada en el control del ciclo celular, **Mdm2**, juega un papel importante en la degradación de GRK2 (Salcedo et al. 2006). Su asociación con GRK2, y la consecuente proteólisis de la quinasa, aumenta con la estimulación β -adrenérgica. Por el contrario, la activación de la vía PI3K/Akt por agonistas como IGF1 altera la degradación de GRK2 mediada por Mdm2, llevando a un aumento en sus niveles (Salcedo et al. 2006).

Además, el **estrés oxidativo** reduce los niveles y actividad de GRK2 al 50% por degradación dependiente de calpaína en linfocitos (Lombardi et al. 2002).

3.5. Funciones biológicas e implicaciones patológicas de GRK2 y GRK5

Estudios *in vitro* han demostrado que GRK2 es capaz de fosforilar prácticamente a todos los **GPCRs** ensayados. Sin embargo, la fosforilación de receptores por diferentes GRKs en tejidos concretos ha demostrado ser mucho más selectiva *in vivo*. Además el papel de GRK2 y GRK5 en distintas situaciones fisiopatológicas puede también estar relacionado con sus **funciones no canónicas**.

3.5.1. Desarrollo embrionario

Los embriones GRK2^{-/-} mueren antes del día 15,5 de la gestación, mostrando una hipoplasia pronunciada en el miocardio ventricular, con hipoplasia y displasia del septo intraventricular (Jaber et al. 1996).

Sin embargo, los ratones KO para GRK2 específicamente en corazón se desarrollan con normalidad, lo que indica que GRK2 no tiene un papel esencial específico en el desarrollo del corazón, sino un papel más amplio en la embriogénesis (Matkovich et al. 2006).

3.5.2. Inflamación

Tanto GRK2 como GRK5 actúan, en la mayoría de los estudios publicados, como **reguladores negativos de procesos inflamatorios**.

Entre los GPCRs que modula GRK2 destacan receptores importantes en el sistema inmune como el receptor β 2-adrenérgico y los receptores de quimioquinas CCR2b y CCR5, que median efectos quimiotácticos y de pro-adhesión en los linfocitos en respuesta a sustancias quimioatrayentes producidas localmente.

La expresión y actividad de GRK2 aumentan en linfocitos T activados (De Blasi et al. 1995). Sin embargo, los niveles de GRK2 están disminuidos en el pico de un proceso inflamatorio como la artritis reumatoide inducida por adyuvante, en esplenocitos y nódulos linfáticos mesentéricos (Lombardi et al. 2001). Además, los niveles y actividad de GRK2 están disminuidos en linfocitos periféricos de pacientes con esclerosis múltiple (Vroon et al. 2005) y en pacientes con artritis reumatoide (Lombardi et al. 1999), y en linfocitos T y monocitos de ratones GRK2+/- se observa una respuesta incrementada a las quimioquinas CCL3, CCL4 y CCL5 (Vroon et al. 2004).

GRK2 fosforila también otras moléculas implicadas en migración o inflamación como son el receptor de PDGF, tubulina, o ezrina, e interacciona con múltiples proteínas implicadas en migración como Akt, PI3K o GIT (revisado en Penela et al. 2008).

Por su parte, GRK5 es capaz de inhibir la fosforilación de ERK1/2 en macrófagos (Parameswaran et al. 2006), y puede inhibir procesos dependientes de NF κ B como producción de citoquinas e inflamación (Sorriento et al. 2008).

En coherencia con su papel inhibitorio en la respuesta inflamatoria, y aunque hay todavía pocos estudios al respecto, se ha descrito para GRK2 y GRK5 un **papel neuroprotector** en el sistema nervioso.

GRK5 protege frente al desarrollo

temprano de la enfermedad de Alzheimer, ya que inhibe la respuesta inflamatoria de la microglía y astrogliá en presencia de un exceso de fibras β -amiloides (Li et al. 2008).

Por su parte, GRK2 protege frente al daño tisular por hipoxia-isquemia en el cerebro, por un mecanismo que implica a las células microgliales y macrófagos (Nijboer et al. 2008).

3.5.3. Cáncer

Algunas evidencias emergentes podrían sugerir un papel para GRK2 y GRK5 en migración y cáncer, que puede ser positivo o negativo **dependiendo del contexto y tipo celular**.

GRK2 modula positivamente la actividad de la cascada de ERK en respuesta a adhesión y esfingosina 1 fosfato (S1P) (Penela et al. 2008) y reprime la señalización apoptótica de Smad2 y Smad3 inducida por TGF β (Ho et al. 2005) en células epiteliales y hepatocitos, respectivamente. Los niveles de GRK2 están aumentados en pacientes con tumores ováricos (King et al. 2003) y su actividad está aumentada en células de carcinoma de tiroides (Metaye et al. 2002). En línea con estos datos, RKIP, inhibidor específico de GRK2 tras su fosforilación por PKC (Lorenz et al. 2003), es un potente gen supresor de metástasis (Keller et al. 2004). Sin embargo, la formación y el crecimiento de tumores de próstata se retardan al inhibir GRK2 (Bookout et al. 2003).

Por otro lado, recientemente se ha descrito que GRK5, pero no GRK2 ni GRK6, fosforilan a p53 en T55, lo que promueve su degradación y por tanto la inhibición de la respuesta apoptótica al daño genotóxico dependiente de p53 (Chen et al. 2010). Además, la expresión de GRK5 está disminuida en muestras de carcinoma diferenciado de tiroides respecto a muestras de tejido normal (Metaye et al. 2002).

Por último, datos recientes de nuestro grupo sugieren un papel para GRK2 en la correcta progresión del ciclo celular (Penela et al. 2010).

3.5.4. Diabetes

Varios trabajos apuntan a GRK2 como un modulador negativo de la vía de insulina a varios niveles.

El receptor de insulina, a pesar de no ser un GPCR, es capaz de activar a G $\alpha_{q/11}$ por fosforilación en tirosina promoviendo así la

translocación del transportador GLUT4, y por tanto la captación de glucosa, a través de la vía $G_{q/11}$ /PI3K. GRK2 endógena, a través de su dominio RH, **inhibe el transporte de glucosa estimulado por insulina**, por interferir con esta translocación al interaccionar con $G_{q/11}$ en adipocitos (Usui et al. 2004), sin afectar a la fosforilación del receptor de insulina.

Este mecanismo, por el que GRK2 inhibe la activación de $G_{q/11}$ de manera independiente de actividad quinasa, también está implicado en la generación de resistencia a insulina inducida por el receptor de endotelina, GPCR acoplado a esta proteína G. Sin embargo, se ha descrito un segundo mecanismo, dependiente de actividad quinasa, por el que GRK2 mediaría la resistencia a insulina inducida por endotelina en adipocitos, a través de la **fosforilación del sustrato del receptor de insulina IRS1 en serina, que promueve su degradación** (Usui et al. 2005).

GRK2 participaría también en la resistencia a insulina inducida por estimulación β -adrenérgica, lo que puede estar relacionado con la asociación existente entre la resistencia a insulina y la patología cardiovascular, en la que se detecta una activación crónica de estos GPCRs. El mecanismo implicado en este proceso es diferente al descrito para la resistencia insulina inducida por endotelina, ya que en este caso GRK2 **inhibe la activación de IRS1 a través de su fosforilación** en un residuo indeterminado.

Estos autores también mostraron que los niveles de expresión de GRK2 aumentan tras la estimulación con insulina, y que la sobreexpresión de GRK2 ya de por sí induce resistencia a insulina en células HEK293. Además, sintetizaron un péptido inhibidor de GRK2, en base a la secuencia catalítica de GRK2, denominado Ant-124, que es capaz de impedir la fosforilación de IRS1 *in vitro*, y aunque no demuestran su especificidad *in vivo*, este inhibidor mejora la homeostasis de la glucosa (Cipolletta et al. 2009). Esto concuerda con observaciones previas en las que la inhibición de la actividad de GRK2-3 mostraba un **efecto antidiabético** en varios modelos animales de diabetes tipo II (Anis et al. 2004).

3.5.5. Función cardiovascular

Los niveles y actividad de GRK2 aumentan hasta 3 veces en linfocitos de pacientes hipertensos (Gros et al. 1997),

hecho relacionado con la mayor prevalencia de hipertensión detectada en pacientes afroamericanos (Cohn et al. 2009).

La sobre-expresión de GRK2 en músculo liso vascular conduce a un aumento en la presión sanguínea que desemboca en el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Eckhart et al. 2002). Puesto que, entre otros efectos, esta quinasa también inhibe la producción del vasodilatador NO en células endoteliales (Liu et al. 2005) y es clave en la regulación del receptor de endotelina, protagonista en la enfermedad vascular (Morris et al. 2010), **GRK2 podría jugar un papel causal de la patología vascular hipertensiva.**

La inhibición sistémica de GRK2 podría reducir la hipertensión arterial, ya que ratones con niveles disminuidos de GRK2 en células de músculo liso vascular desarrollan una menor hipertensión portal (Liu et al. 2005). Estos resultados apuntan a que GRK2 estaría modulando diferencialmente a los receptores GPCR de tipo vasodilatador (β -adrenérgicos, adenosina, dopamina) frente a aquellos vasoconstrictores (α -adrenérgicos, angiotensina, endotelina) induciendo una respuesta global del tipo hipertensivo (Feldman 2002; Harris et al. 2008).

A nivel de miocardio, la actividad (Ping et al. 1997; Vinge et al. 2001) y/o los **niveles de expresión de GRK2 están aumentados** en fases tempranas del **fallo cardíaco** en varios modelos animales, en modelos de isquemia cardíaca (Ungerer et al. 1996), en **hipertrofia** inducida por constricción aórtica (Choi et al. 1997) y en corazones de pacientes con **cardiomiopatía isquémica y dilatada** (Ungerer et al. 1993), mientras que se reducen con el ejercicio (Strom et al. 2005). Además, la elevación en los niveles de GRK2 en el fallo cardíaco parece aumentar con la severidad de la enfermedad (Iaccarino et al. 2005). Los cambios en los niveles de GRKs cardíacos pueden deberse a la estimulación crónica β -adrenérgica, que incrementa los niveles de GRK2 tanto en corazón (Iaccarino et al. 1998) como en linfocitos periféricos (Oyama et al. 2005), mientras que los agentes β -bloqueantes tienen el efecto contrario.

La **sobreexpresión de GRK2ct**, un inhibidor de la activación de GRK2 por $G_{\beta\gamma}$, promueve una **mayor contractilidad cardíaca** en respuesta a estímulos β -adrenérgicos o Angiotensina II (Rockman

et al. 1998), **previene el desarrollo de miocardiopatía** en modelos animales de cardiopatía dilatada (Harding et al. 2001), revierte la desensibilización β -adrenérgica (Rockman et al. 1998), **rescata la funcionalidad cardíaca, previene la hipertrofia**, mejora la tolerancia al ejercicio (Freeman et al. 2001), incrementa la supervivencia de los cardiomiocitos (Khoury SJ 2002) y disminuye los niveles circulantes de catecolaminas (si se sobre-expresa en las glándulas adrenales) (Lymperopoulos et al. 2008). Sin embargo, la **sobre-expresión de GRK2** en el corazón no provoca *per se* patología cardíaca, aunque sí una **contractilidad cardíaca disminuida** (Koch et al. 1995).

4. PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)

Las Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos (MAPK) son clave en el establecimiento de respuestas concretas a estímulos extracelulares. Juegan un papel importante en la regulación de numerosos procesos celulares como el crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis (Dhanasekaran et al. 2007).

4.1. Tipos

En mamíferos, las subfamilias de MAPK mejor caracterizadas son: las quinasas reguladas por señal extracelular (**ERK1 y ERK2**), las quinasas del extremo N-terminal de c-jun (**JNK**) y las quinasas **p38** (Pearson et al. 2001). Existen al menos otros dos grupos de MAPK: ERK3 y 4, y ERK5 (revisado en Roux et al. 2004)

ERK1 y 2 también son denominadas MAPK. p38 y JNK son también conocidas como quinasas activadas por estrés (SAPK).

De la MAPK **p38** se han descrito cuatro isoformas: **α , β , γ y δ** (Kyriakis et al. 2001), que comparten un 60% de homología en la secuencia y un 90% dentro del dominio quinasa, y presentan una expresión diferencial en distintos tejidos, así como diferentes activadores, efectores y funciones. p38 α y p38 β se expresan en la mayoría de los tejidos, mientras que p38 γ y p38 δ tienen un patrón de expresión más restringido.

4.2. Mecanismos de activación e inactivación

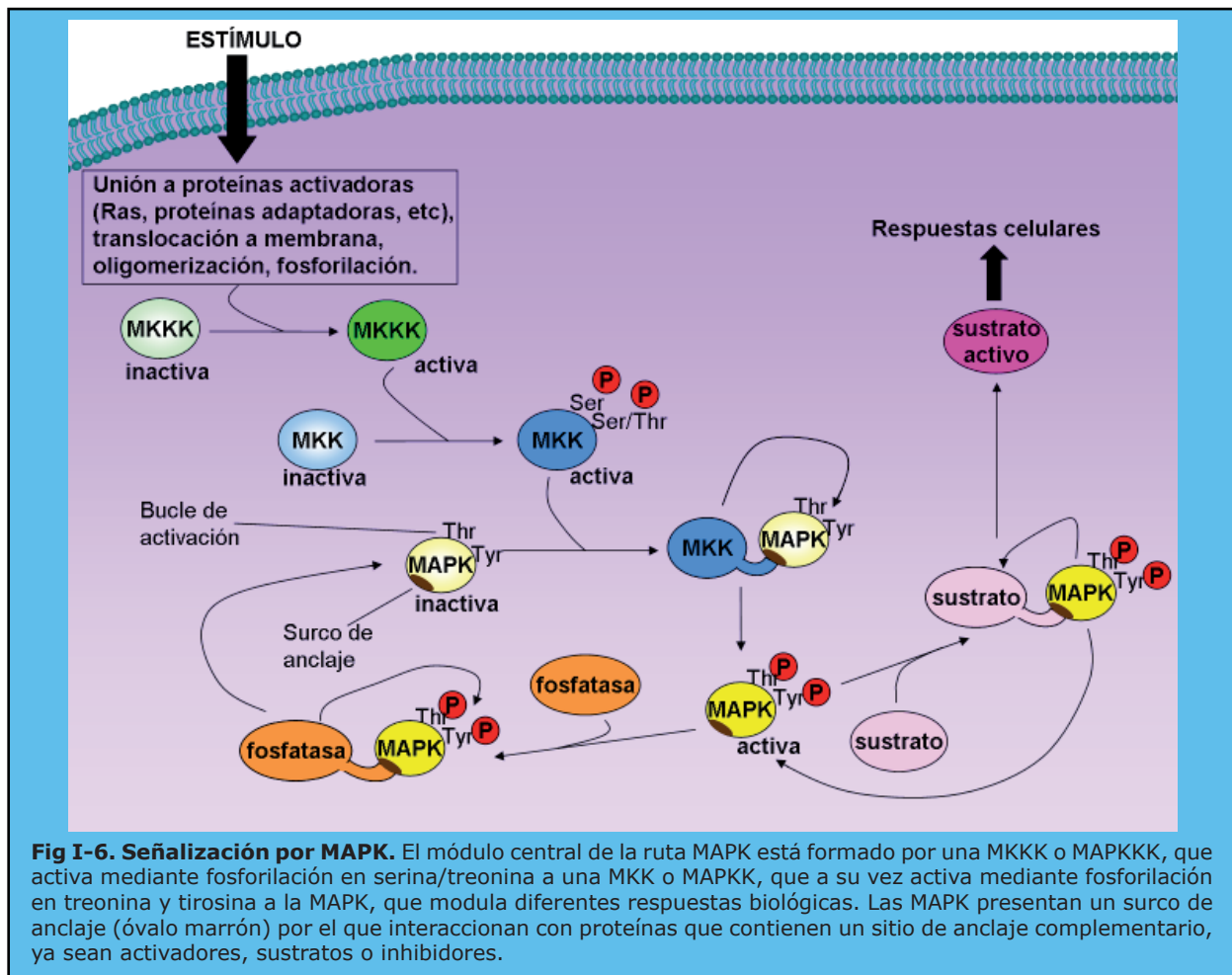
Las vías de señalización de MAPK incluyen un **módulo central** en el que la proteína MAPK es activada por fosforilación en tirosina y treonina de un motivo conservado Thr-X-Tyr dentro de su bucle de activación flexible. Esta fosforilación induce que este bucle se desplace para permitir el mejor acceso de los sustratos, y además altera la conformación del sitio catalítico, haciéndolo más activo (Cuenda et al. 2007). Los miembros de p38 comparten el motivo de fosforilación dual TGY, mientras que este motivo es TEY para ERK y TPY para JNK (New et al. 1998). Esta fosforilación la llevan a cabo quinasas duales que reciben el nombre de MKKs, y que, a su vez, tienen que ser activadas por fosforilación en Serina/Treonina por unas quinasas conocidas como MKKK o MAP3K (**figura I-6**) (Kyriakis et al. 2001; Pearson et al. 2001).

La activación de estos módulos depende del contexto celular y suele implicar mecanismos de regulación espacio-temporal (Goldsmith et al. 2007). La regulación de las MAPKK se realiza por reclutamiento a la membrana, oligomerización y fosforilación y/o como resultado de su interacción con pequeñas **proteínas G monoméricas** de la familia de Ras/Rho en respuesta a estímulos extracelulares (Roux et al. 2004).

La activación de MAPK por **GPCRs** está muy conservada en la evolución (Pierce et al. 2002) y tiene lugar a través de diferentes vías, incluyendo mecanismos dependientes tanto de **G α** como de **G $\beta\gamma$** , que varían con el contexto celular.

Las MAPK también pueden activarse a través de **receptores tirosina quinasa** o a través de **proteínas andamio** específicas, como las arrestinas, que relacionan los GPCRs con los módulos MAPK. Por ejemplo, se ha descrito que el receptor de angiotensina AT1R mutante incapaz de activar a G $\alpha_{q/11}$ sigue activando efectores moleculares como ERK y promueve hipertrofia cardíaca (Zhai et al. 2005).

La especificidad de las respuestas mediadas por las MAPK viene determinada por un equilibrio entre su activación y su **inactivación**, que tiene lugar por la intervención de fosfatasas o la interacción de la MAPK con otras moléculas reguladoras.



4.2.1. Módulo ERK1/2

La cascada de ERK consiste en las MAPKKK A-Raf, B-Raf y Raf1, las MAPKKs MEK1 y MEK2, y las MAPKs ERK1 y ERK2 (Roux et al. 2004).

Este módulo se activa fuertemente por factores de crecimiento, suero, ésteres de forbol y, en menor grado, por ligandos de GPCRs, citoquinas, estrés osmótico y desorganización de microtúbulos (Lewis et al. 1998).

En cuanto a su regulación, varias proteínas interaccionan con los miembros de la cascada, incluyendo a las proteínas andamio MP1, KSR y β -arrestinas, y los moduladores CNK y RKIP (Peyssonnaud et al. 2001).

4.2.2. Módulo p38

La cascada de p38, también conocida como CSBP, mHOG1, RK y SAPK2, consiste en las MAPKKKs MEKKs 1-4, MLK2/3, DLK, ASK1, Tp12 (Cot), y Tak1, las MAPKKs MEK3/6 (también llamadas MKK3 y 6) y las cuatro isoformas conocidas de p38 (Kyriakis

et al. 2001).

En mamíferos, la cascada de p38 se activa fuertemente en respuesta a estrés ambiental físico y químico, como estrés oxidativo, radiación ultravioleta (UV), estrés térmico, inhibidores metabólicos como el arsenito sódico, hipoxia, isquemia así como por endotoxinas y varias citoquinas proinflamatorias como IL1 y TNF α , pero no de manera apreciable por estímulos mitogénicos. La mayoría de los estímulos que activan a p38 activan también a JNK (Rouse et al. 1994).

MKK3 y MKK6 muestran una alta especificidad por p38 frente a ERK1/2 y JNK. MKK6 activa a todas las isoformas de p38, mientras que MKK3 es más selectiva de las isoformas α y β (Roux et al. 2004).

Además, la regulación de la duración de la señal es crucial en el funcionamiento de p38. La duración de la señal está controlada por fosfatasa, que incluyen múltiples Ser/Thr fosfatasa como la proteína fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A), tirosina-fosfatasa, o fosfatasa de especificidad dual (también

llamadas fosfatasa de MAPK) (Coulthard et al. 2009).

Se han descrito también mecanismos alternativos de activación para p38 α , por autofosforilación (Li et al. 2005; Rudd 2005).

4.3. Dianas moleculares y localización subcelular

4.3.1. ERK

ERK1/2 fosforila a sustratos en todos los compartimentos celulares: proteínas de membrana (CD120a, Syk, calnexina), nucleares (SRC1, Pax6, NFAT, Elk1, MEF2, c-Fos, c-Myc y STAT3), proteínas del citoesqueleto (neurofilamentos y paxilina) y distintas quinasas activadas por MAPK o MKs (RSKs, MSKs y MNKs) (Roux et al. 2004).

La dinámica núcleo-citosólica de ERK1/2 es muy compleja y está controlada mediante mecanismos de retención nuclear, dimerización, fosforilación y anclaje citoplásmico (revisado en Pouyssegur et al. 2002).

4.3.2. p38

p38 fosforila a numerosos sustratos celulares como la fosfolipasa A2 citosólica, a la proteína asociada a microtúbulos Tau, y a los factores de transcripción CHOP, NFAT, ATF1/2, Max/c-Myc, AP1, MEF2A, Sap1, Elk1, NFkB, Ets1 y p53. p38 también activa a varias MKs, incluidas MSK1/2, MNK1/2 y MK2/3 (Kyriakis et al. 2001; Roux et al. 2004). p38 γ y δ pueden fosforilar sustratos típicos de p38 (ATF2, Elk1 o SAP1), pero no otros como MK2 o MK3, que sí son buenos sustratos para p38 α y β (Cuenda et al. 2007).

En células en reposo p38 se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma. Tras su activación, algunas evidencias sugieren que se transloca al núcleo (Raingeaud et al. 1995), mientras que otros datos muestran que p38 activa también está presente en el citoplasma (Ben-Levy et al. 1998).

4.4. Regulación

4.4.1. Especificidad de las interacciones

Las MAPK son **serín-treonín quinasas dirigidas por prolina**. Dado el gran abanico de respuestas que median estas proteínas, la especificidad de las MAPK hacia sus sustratos es fundamental, y viene determinada en

mayor medida por un sitio llamado **surco de anclaje** o "docking groove" (Biondi et al. 2003) situado en el lado opuesto al dominio catalítico dentro de la estructura de la proteína (**figura I-6**). Este dominio es el principal determinante de la interacción de las MAPK con sus sustratos fisiológicos, ya que contiene residuos ácidos e hidrofóbicos necesarios para establecer interacciones hidrofóbicas y electrostáticas con los sitios de anclaje o "docking site" complementarios que éstos poseen (Enslen et al. 2000; Tanoue et al. 2001). Estos sitios de anclaje o motivos D contienen una agrupación de residuos con carga positiva rodeada por residuos hidrofóbicos (revisado en Mayor et al. 2007) y normalmente se encuentran lejos del sitio fosfoceptor en la estructura del sustrato. Además, existen otros dominios implicados en el anclaje de las MAPKs a sus sustratos, como los sitios CD (de anclaje común) de ERK1/2.

También se han identificado sitios de anclaje en muchas proteínas reguladoras de las MAPK, como MAPKKs, fosfatasa (PTP-SL, STEP, MKPs) y proteínas andamio (Enslen et al. 2001). Por ello, además de contribuir al mantenimiento de la especificidad y linealidad de las vías de MAPK, los contactos de anclaje también regulan la actividad, selección de sustrato y distribución subcelular de cada MAPK. Además, estas interacciones pueden regularse por fosforilación, exposición o modificación de los dominios de anclaje de las MAPK o las proteínas que interaccionan con ellas.

4.4.2. Fiabilidad y versatilidad de la señal

En las cascadas de MAPK existen componentes con varias funciones biológicas que, según su regulación, pueden activar diferentes vías. Así, se ha propuesto que los módulos de MAPK pueden procesar la información además de transmitirla, y dependiendo de la **localización subcelular** donde la MAPK se active y de otras circunstancias como la presencia o no de **moléculas de anclaje** puede lograrse una u otra respuesta fisiológica (Harding et al. 2005). Así, se han descrito numerosas proteínas andamio y moduladores endógenos de la cascada de ERK que aumentan su señal, median conexiones con otras vías, dirigen los complejos MEK-ERK a localizaciones subcelulares, o bien inhiben la cascada, determinando en conjunto el

comportamiento biológico dinámico de esta vía (Kolch 2005). Las proteínas andamio pueden regular la terminación de la señal MAPK reclutando fosfatasa o promoviendo su degradación (Dard et al. 2006).

Por último, no sólo la expresión de moléculas adaptadoras sino también la **densidad de receptores** en la superficie celular, la **matriz extracelular** circundante y el **equilibrio entre quinasas y fosfatasa** modulan la fuerza y duración de la señalización de las MAPK, de modo que diferentes perfiles espacio-temporales de activación pueden desembocar en diferentes decisiones biológicas (Murphy et al. 2006). También la **dimerización** de ERK parece ser crítica para la unión de esta MAPK a sustratos citoplásmicos (Casar et al. 2008).

4.5. Funciones biológicas e implicaciones patológicas de ERK1/2 y p38

4.5.1. Diferenciación y desarrollo

Clásicamente se ha relacionado ERK con múltiples procesos de diferenciación en diferentes sistemas (Pearson et al. 2001), pero el papel de p38 en diferenciación sólo se ha podido revelar en los últimos años.

Se había relacionado p38 α con la diferenciación de fibroblastos 3T3L1 a adipocitos inducida por insulina, puesto que la expresión de un dominante negativo o el inhibidor SB203580 la bloquean (Engelman et al. 1998). Posteriormente se ha demostrado que p38 α desempeña un papel clave en la diferenciación de otros muchos tipos celulares, como mioblastos, osteoclastos, células epiteliales intestinales, células β -pancreáticas, cardiomiocitos, condrioblastos, queratinocitos (revisado en Cuenda et al. 2007), y células Th1 (Mittelstadt et al. 2005).

4.5.2. Sistema inmune

La actividad de p38 es crítica en la respuesta inmune. Esta MAPK se activa en macrófagos, neutrófilos y células T por numerosos mediadores extracelulares de inflamación como quimioatrayentes, quimioquinas, otras citoquinas como TNF, y otras sustancias como LPS, participando en procesos como quimiotaxis, exocitosis granular, adherencia y apoptosis de macrófagos y neutrófilos. p38 también

media la activación de células T maduras en respuesta a antígeno (Mittelstadt et al. 2005) y su apoptosis mediante la regulación de la producción de interferón- γ . Además, p38 regula la respuesta inmune estabilizando los mRNAs de varias citoquinas proinflamatorias (IL1 β , TNF α , IL6), factores de transcripción y receptores de superficie (Ono et al. 2000), además de inducir la expresión de enzimas (COX2, iNOS), de VCAM-1 y otras moléculas de adhesión implicadas en inflamación (Dong et al. 2002).

p38 regula la respuesta a estrés oxidativo, a sepsis o infección viral (Bulavin et al. 2004) y a estrés hiperosmótico (Lang et al. 2002). De hecho p38 α se purificó y clonó como la diana de una familia de piridinil imidazoles experimentales, los antiinflamatorios supresores de citoquinas (CSAIDs, como el SB203580), que inhibían la producción de TNF e IL1 durante el shock endotóxico (Lee et al. 1994). Los compuestos de esta familia sólo inhiben a p38 α y β , mientras que no afectan a p38 γ y δ (Kyriakis et al. 2001).

La inflamación excesiva es un factor crítico en desórdenes inflamatorios y autoinmunes como la artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis y asma, en enfermedades neurodegenerativas, infección, enfermedades cardiovasculares y cáncer. En la patogénesis de estas enfermedades, p38 controla la síntesis de mediadores inflamatorios al nivel transcripcional y traduccional, lo que hace de esta proteína y de su ruta de transducción de señales objetivos potenciales en la terapia antiinflamatoria, ya que su inhibición reduce tanto la síntesis de citoquinas proinflamatorias como su señalización (Kaminska 2005).

4.5.3. Sistema nervioso

Tanto p38 α como p38 β , están activadas en cerebro en modelos animales de neurodegeneración, lo que conduce a respuestas fisiológicas alteradas con liberación de citoquinas proinflamatorias y neurotoxicidad. Además, p38 se encuentra frecuentemente asociada a depósitos de la proteína tau, sustrato de p38, lo que puede contribuir al desarrollo de diversas taupatías como la enfermedad de Alzheimer (Coulthard et al. 2009).

4.5.4. Proliferación y cáncer

ERK1/2 puede mediar tanto **proliferación celular** como **apoptosis**, dependiendo entre otros factores de su localización subcelular. La función clásica

de la cascada Ras-Raf-MEK-ERK es la proliferación celular, para lo que es esencial la translocación al núcleo mediada por estímulos mitogénicos de ERK, que mientras está inactiva se encuentra anclada al citoplasma por su asociación con MEK, la red de microtúbulos o con fosfatasa. Ras está mutada y constitutivamente activa en el 30% de los tumores humanos, y B-Raf en el 70% de los melanomas malignos (Mercer et al. 2003), por lo que se ha considerado a los inhibidores de la vía de ERK como potenciales agentes antitumorales (Roberts et al. 2007).

Sin embargo, la retención citosólica de ERK1/2 impide su acceso a los factores de transcripción responsables de la respuesta proliferativa y de supervivencia, además de activar algunas proteínas pro-apoptóticas como la quinasa DAP y otras proteínas citoplásmicas como fosfolipasa A2, proteínas del citoesqueleto o fosfodiesterasas. Algunas proteínas que pueden retener ERK activada fuera del núcleo permitiendo su señalización hacia sustratos citosólicos son β -arrestina (Luttrell 2003) y Sef, que reside en el aparato de Golgi (Torii et al. 2004).

p38 puede también tener un papel tanto positivo como negativo en la proliferación celular, según el tipo celular y el estímulo (Nebreda et al. 2000). Así, p38 α inhibe específicamente la señalización de oncogenes que producen especies reactivas de oxígeno (ROS), **induciendo apoptosis**. Por ello, líneas tumorales altamente tumorigénicas han desarrollado mecanismos para desacoplar la activación de p38 α de la producción de ROS (Dolado et al. 2007).

Además, la activación de p38 es necesaria para la inducción de apoptosis por varios agentes quimioterapéuticos de distinto mecanismo (Coulthard et al. 2009), como paclitaxel (taxol) en células derivadas de cáncer de próstata (Skjoth et al. 2006).

Además, p38 es esencial en la apoptosis inducida por daño en el DNA a través de la fosforilación de p53 (Bulavin et al. 1999), o induciendo la expresión del coactivador transcripcional de p53 p18^{Hamlet} (Cuadrado et al. 2007). Así, la apoptosis causada por el agente genotóxico cisplatino requiere la activación de p53 mediada por p38 a través de la generación de ROS (Bragado et al. 2007).

Sin embargo, la inducción de apoptosis mediada por p38, aparte de conducir a la

muerte a las células tumorales, puede promover su supervivencia cuando estas células utilizan este sistema para evadir al sistema inmune, como ocurre en células tumorales de mieloma múltiple que secretan IL6, IL1 β y TGF β al medio para activar p38 e inhibir ERK en las células dendríticas cercanas para promover su apoptosis (Wang et al. 2006).

La vía de p38 está también implicada en los **puntos de control del ciclo** celular de G1/S (Molnar et al. 1997) y G2/M (Bulavin et al. 2001). p38 regula la transición G2/M y G1/S a través de la activación de MK2, una quinasa que regula estas transiciones en respuesta a UV (Manke et al. 2005). En ausencia de p53 las células cuentan con una tercera vía de señalización para la parada del ciclo, además de ATM-Chk2 y ATR-Chk1, que implica a p38-MK2 (Reinhardt et al. 2007).

Así, aunque p38 clásicamente se ha asociado con la inducción de apoptosis, también puede **mediar supervivencia**. En células Jurkat, en linfoma humano de células B o células de osteosarcoma, p38 se activa con agentes genotóxicos, pero la inhibición de esta vía incrementa la muerte celular, ya que favorece la parada en G2/M y la reparación del DNA (Thornton et al. 2009). En esta línea, el tratamiento con cisplatino provoca la fosforilación de la histona H3 por p38, lo que promueve la condensación cromosómica que permite la reparación del DNA (Wang et al. 2004).

En resumen, p38 contribuye a la resistencia de células tumorales frente a agentes genotóxicos, y está también implicada en la supervivencia de tumores sin daño en el DNA, así como en fenómenos de metástasis a través de la activación de metaloproteasas (Cuenda et al. 2007).

Por último, p38 puede también mediar la proliferación de células no malignas como fibroblastos y células hematopoyéticas, así como la supervivencia de granulocitos, fibroblastos, neuronas y cardiomiocitos (Zarubin et al. 2005; Thornton et al. 2009), en los que la activación de p38 protege frente a la apoptosis inducida por anisomicina (Zechner et al. 1998).

Se han sugerido diferentes papeles de las **isoformas α y β** en las vías de apoptosis o

supervivencia de p38. Así, en cardiomiocitos, células Jurkat y Hela, p38 α induce apoptosis mientras que p38 β potencia la supervivencia (revisado en Nebreda et al. 2000). Además, p38 α inhibe la proliferación al antagonizar la vía de JNK en varios tipos celulares y en cáncer hepático (Hui et al. 2007).

4.5.5. Función cardiovascular

Las cascadas MAPK se activan en cardiomiocitos por GPCRs (angiotensina, endotelina, adrenérgicos, etc), receptores tirosina-quinasa (IGF1, insulina, etc), receptores Ser-Thr quinasas (TGF β , etc), por cardiotrofina y por estímulos de estrés (Ocaranza et al. 2009).

ERK1/2 está implicada en el desarrollo de la **hipertrofia cardíaca**. ERK1/2 se activa en respuesta a prácticamente todos los agonistas hipertróficos conocidos (Bueno et al. 2002), y media un aumento en el tamaño celular y la reorganización sarcomérica de los cardiomiocitos, provocando un incremento en la actividad transcripcional de NFAT y en la expresión del péptido natriurético atrial (ANP). Así, la inhibición de ERK impide la hipertrofia en respuesta a endotelina, fenilefrina, isoproterenol, o por sobrecarga de presión (Ueyama et al. 2000). Esta hipertrofia se asocia a una función cardíaca aumentada y resistencia parcial a la apoptosis, sin comprometer la función cardíaca ni la supervivencia del animal a largo plazo (Bueno et al. 2000), lo que sugiere que la actividad de ERK promueve una hipertrofia **de tipo compensado**, con una componente cardioprotectora (Wang 2007). En línea con estos datos, niveles basales elevados de ERK activa se asocian con un fenotipo hipertrófico, con una mayor tasa de proliferación de cardiomiocitos y una reducida apoptosis durante el desarrollo. Estos animales desarrollan **protección** frente a la cardiomiopatía que se genera tras sobrecarga de presión a largo plazo y frente al daño posterior al infarto de miocardio (Maillet et al. 2008).

Así, se ha propuesto que la inhibición de ERK1/2 *in vivo* podría revocar la hipertrofia cardíaca y promover apoptosis en los cardiomiocitos, lo que sería útil en pacientes con hipertrofia pero función sistólica conservada.

La activación de **p38**, por el contrario, conduce a **fallo congestivo por una**

prominente fibrosis cardíaca intersticial en modelos murinos, y está implicada en el establecimiento y progresión de la disfunción cardiovascular causada por daño isquémico, remodelado fibrótico y sobrecarga de presión (Zhang et al. 2003). La activación de p38 en el corazón promueve fallo cardíaco juvenil con **pérdida de contractilidad** y adelgazamiento de las paredes ventriculares, causando la muerte temprana. Aunque no se observa hipertrofia, sí se induce la expresión de genes marcadores de hipertrofia cardíaca y patología como el ANP, β -MHC y actina α -esquelética, y la represión de genes cardíacos fisiológicos como α -MHC y la calcio-ATPasa del retículo sarcoplásmico SERCA2a, lo que apunta a un papel de p38 en la **regulación de la expresión génica bajo estrés patológico** (Liao et al. 2001; Petrich et al. 2004). Además p38 α media la producción de citoquinas inflamatorias como IL6, IL8 y CCL2, e incrementa la expresión del receptor de inmunidad innata TLR2, provocando la **infiltración masiva de células inflamatorias** en el corazón (Tenhunen et al. 2006). La vía de p38 está también implicada en la regulación del metabolismo energético cardíaco, y en la respuesta cardíaca a estrés metabólico, regulando entre otras la expresión de COX2 y la biosíntesis de prostaglandinas (Degousee et al. 2003; Rebsamen et al. 2003).

La inhibición farmacológica o genética de p38 previene el daño cardíaco causado por fibrosis y apoptosis, el daño tisular secundario a la situación de hipertensión en otros órganos (Olzinski et al. 2005) y mejora la contractilidad en modelos animales de fallo cardíaco (Kyoj et al. 2006).

p38 α promueve también la **apoptosis**, mediante la reducción de la actividad o expresión de los miembros de la familia anti apoptótica Bcl_{XL} y Bcl2, y la modulación de proteínas proapoptóticas como p53 (Bulavin et al. 1999), Bax y Fas y la activación de la vía de ERK (Porras et al. 2004) y de Akt (Zuluaga et al. 2007). Sin embargo, mientras que p38 α sensibiliza a fibroblastos y cardiomiocitos para la apoptosis inducida por diferentes estímulos, como la privación de suero, radiación UV, la presencia de ionóforos de calcio (Porras et al. 2004), y la isquemia/reperfusión (Ma et al. 1999), la activación de p38 en el corazón intacto, por si sola, no es suficiente para inducir una apoptosis de miocitos significativa (Wang et al. 1998).

Por otro lado, aunque p38 se activa

potentemente por deformación mecánica, ligandos de GPCRs (angiotensina II, endotelina-1 y adrenalina), por constricción aórtica en modelos experimentales de hipertensión y en el fallo cardíaco humano secundario a la enfermedad coronaria avanzada (Cook et al. 1999), se ha observado una **reducción de la activación de p38 en estadios terminales** de fallo cardíaco humano y en modelos animales (Lemke et al. 2001; Communal et al. 2002). Así, algunos trabajos apuntan a la ruta de p38 como factor clave en la transición al fenotipo patológico (Buermans et al. 2005).

5. FUNCIÓN Y PATOLOGÍA CARDÍACAS

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo, responsables del 30% de los decesos en el año 2005 según la OMS. Típicamente consideradas como enfermedades propias de los países desarrollados, su incidencia está aumentando en los países en vías de desarrollo, y cerca del 80% de las muertes contabilizadas en 2005 tuvo lugar en países con ingresos bajos o medios, donde el bajo estatus socio-económico puede favorecer la exposición a factores de riesgo como el tabaco o una dieta inadecuada.

Según la Asociación Americana del Corazón, en el 90% de los pacientes el fallo cardíaco está precedido de hipertensión, siendo ésta un factor de riesgo crítico para la hipertrofia cardíaca patológica (Brinks et al. 2010).

El corazón está constituido esencialmente por tejido muscular (miocardio), y en menor proporción por tejido conectivo y fibroso. Al analizarlo se estudia principalmente el ventrículo izquierdo, ya que en éste el tejido muscular es más abundante por ejercer el trabajo de expeler la sangre a todo el organismo, mientras que el ventrículo derecho se limita a impulsar la sangre a la circulación pulmonar.

La frecuencia y la fuerza de la sístole o contracción cardíaca están reguladas por el sistema nervioso autónomo y otros factores humorales o mecánicos, y se adaptan a las necesidades del organismo. Así, el músculo cardíaco responde a estímulos

transitorios mediante la regulación de su fuerza y ritmo contráctil, en tanto que la estimulación neurohumoral constante tiene como consecuencia un remodelado del tejido cardíaco (Wakatsuki et al. 2004).

En el desarrollo postnatal del corazón, desde el nacimiento hasta la edad adulta, existe un **equilibrio entre los estímulos que promueven el crecimiento de los miocitos y los que pueden conducir a su muerte**, que puede alterarse en algunas patologías como la diabetes y la hipertensión (Nadal-Ginard 2001).

Sin embargo, la mayoría de los cardiomiocitos adultos no son capaces de proliferar, y responden al estrés alargándose o engrosándose, dando lugar al crecimiento o hipertrofia del corazón.

5.1. Hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca puede ser **concéntrica o excéntrica**, según la morfometría que adopte la cámara del ventrículo izquierdo (**figura I-7**). La hipertrofia excéntrica se caracteriza por un aumento en la masa del corazón y del volumen de la cámara, mientras que el grosor relativo de la pared puede ser normal, o bien estar disminuido o aumentado. Ocurre comúnmente en condiciones de ejercicio isotónico, sobrecarga de volumen o después de un infarto, y se distingue por la adición de sarcómeros en serie y un crecimiento longitudinal de los cardiomiocitos (Hill et al. 2008). En general es adaptativa durante un largo período de tiempo antes de progresar hacia la descompensación funcional y la cardiopatía dilatada. En cambio, la hipertrofia concéntrica suele ser más maladaptativa, y predicablemente lleva más rápidamente a una descompensación funcional. Este tipo de hipertrofia consiste en un aumento en el grosor relativo de la pared y masa cardíaca, sin cambios o con pequeñas modificaciones en el volumen de la cámara. Normalmente es el resultado de la sobrecarga de presión, y en ella la adición de sarcómeros ocurre en paralelo, con un crecimiento en grosor de los cardiomiocitos (Dorn 2007).

La hipertrofia puede catalogarse también como **adaptativa o maladaptativa**, según el resultado funcional, y como fisiológica o patológica, según su progreso. El crecimiento **fisiológico** del corazón ocurre en individuos sanos en respuesta a ejercicio o sobrecarga

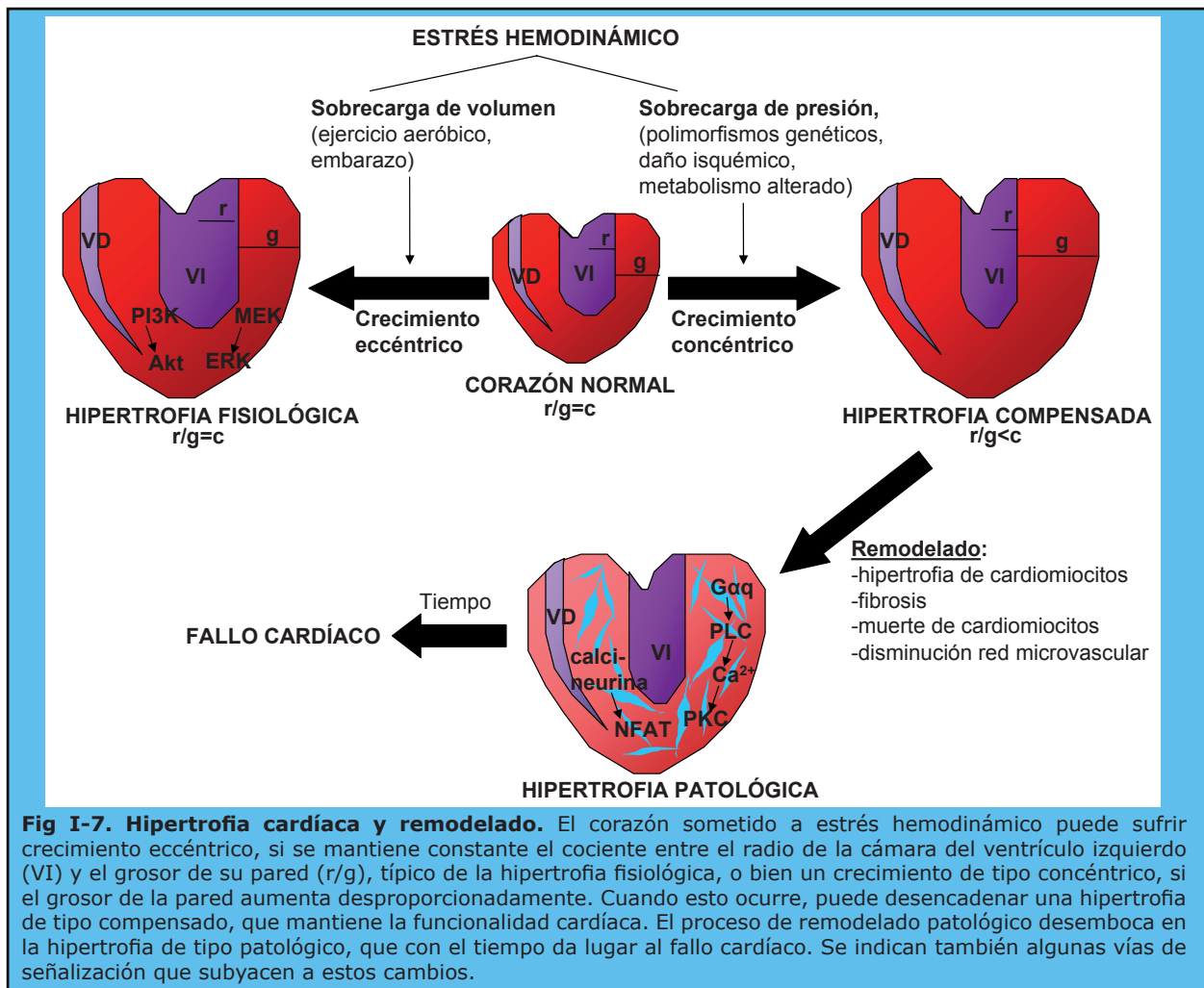


Fig I-7. Hipertrofia cardíaca y remodelado. El corazón sometido a estrés hemodinámico puede sufrir crecimiento eccéntrico, si se mantiene constante el cociente entre el radio de la cámara del ventrículo izquierdo (VI) y el grosor de su pared (r/g), típico de la hipertrofia fisiológica, o bien un crecimiento de tipo concéntrico, si el grosor de la pared aumenta desproporcionadamente. Cuando esto ocurre, puede desencadenar una hipertrofia de tipo compensada, que mantiene la funcionalidad cardíaca. El proceso de remodelado patológico desemboca en la hipertrofia de tipo patológico, que con el tiempo da lugar al fallo cardíaco. Se indican también algunas vías de señalización que subyacen a estos cambios.

de volumen, durante el embarazo y en los atletas. En estos casos, los cardiomiocitos suelen crecer longitudinalmente, pero no se detectan cambios en la expresión de genes fetales ni colágeno, aunque sí se inducen genes que codifican para proteínas de la matriz extracelular y del citoesqueleto, proteínas ribosomales, y algunas proteínas requeridas para el crecimiento estructural de los cardiomiocitos (Strom et al. 2005). Este tipo de hipertrofia no está asociada a daño cardíaco y es homogénea, ya que aumentan de manera proporcional los componentes musculares y no musculares, fundamentalmente fibroblastos, del tejido cardíaco (Heineke et al. 2006).

En cambio, la **hipertrofia patológica** se inicia como un mecanismo compensatorio, pero finalmente conduce a un detrimento en la función del ventrículo izquierdo, siendo un importante factor de riesgo para el fallo cardíaco (Levy et al. 1990). Si los cardiomiocitos sufren estrés por sobrecarga de presión, su crecimiento se asocia a una

expresión anormal de genes y un incremento en el depósito extracelular de matriz por los fibroblastos cardíacos (Heineke et al. 2006). Este tipo de hipertrofia se relaciona con un crecimiento en el grosor de los cardiomiocitos, y está asociada con un mal pronóstico por contribuir al desarrollo de arritmias, disfunción diastólica y fallo cardíaco congestivo (Okin et al. 2004). Se trata de una hipertrofia de tipo no homogéneo, ya que resulta en un incremento de la masa de fibroblastos acompañada de una pérdida de cardiomiocitos por apoptosis. Las principales causas de la hipertrofia patológica son la hipertensión, polimorfismos genéticos, el daño isquémico y un metabolismo cardíaco alterado. La mayoría de las mutaciones identificadas en las cardiopatías heredadas corresponden a proteínas sarcoméricas, que afectan a la contractilidad.

El paso de una hipertrofia funcional a una situación patológica viene dado por el llamado **remodelado cardíaco**, que reúne varios

eventos: la hipertrofia de los cardiomiocitos, la muerte de cardiomiocitos por apoptosis, necrosis programada y autofagia, la fibrosis intersticial y una disminución de la red microvascular (revisado en (Dorn 2009)). Aunque de manera aguda tiene características adaptativas, como el depósito de matriz extracelular en la zona del infarto para prevenir la ruptura del corazón, o la hipertrofia que es inicialmente beneficiosa para mantener el flujo sanguíneo, acaba provocando una descompensación funcional y el desarrollo de fallo cardíaco (Muslin 2008). Así, la fibrosis altera el nivel de organización tridimensional del músculo e incrementa la rigidez del miocardio, lo que reduce la eficacia del corazón. Además, la fibrosis promueve más hipertrofia y muerte celular, resultando en un ciclo muy perjudicial de crecimiento cardíaco y pérdida de miocitos (Barry et al. 2008). El remodelado patológico también implica un cambio en el balance entre la presencia de metaloproteasas y sus inhibidores (Opie et al. 2006). Así, para identificar la existencia del remodelado patológico en clínica se utilizan marcadores de hipertrofia (cardiotrofina), apoptosis (anexina 5) y fibrosis cardíaca (procolágeno tipo I y el balance entre la metaloproteína 1 y su inhibidor) detectables en sangre (Gonzalez et al. 2009).

Los **mecanismos que desencadenan el remodelado** cardíaco no están aún bien esclarecidos. A nivel celular, la hipertensión somete a los cardiomiocitos a estrés mecánico y a la acción de péptidos vasoactivos como endotelina y angiotensina, que puede conducir a un incremento en la síntesis proteica, cambios en el citoesqueleto y expresión de genes embrionarios como el ANP, afectándose la contractilidad del cardiomiocito (Force et al. 1996). El remodelado cardíaco puede ser también el resultado de mecanismos inflamatorios desencadenados por el miocardio necrótico, la generación de ROS y por un incremento en el estrés de la pared en la zona borde de un infarto.

Se han descrito además algunas alteraciones en la señalización celular durante el remodelado. Así, durante la hipertrofia y antes del remodelado patológico, el receptor de angiotensina AT1R aumenta su expresión, y las MAPK ERK1/2, ERK5, JNK y p38 están activadas. Sin embargo, en el fallo cardíaco congestivo la expresión de AT1R vuelve a

la normalidad, aunque se regula a la baja el receptor AT2R, los niveles de G_q y G_{q12} disminuyen, y las MAPK ERK, JNK y p38 están inhibidas, mientras que ERK5 vuelve a la normalidad (Kacimi et al. 2003).

También se ha establecido que el crecimiento cardíaco normal y el inducido por ejercicio están mediados por factores de crecimiento como IGF1, insulina o agonistas neurohormonales hipertróficos como angiotensina II, y regulados en gran parte por la vía de señalización PI3K/Akt. En cambio, el crecimiento cardíaco reactivo o patológico, provocado por los elevados niveles de factores paracrin y neurohormonales como angiotensina II, endotelina y catecolaminas liberados durante el estrés biomecánico, se regula principalmente través de la vía G_q /PLC/ Ca^{++} /PKC y calcineurina/NFAT (Dorn et al. 2005; Dorn 2007).

Así, el aumento de calcio intracelular provoca la translocación de factores de transcripción pro-hipertróficos al núcleo, y además el deterioro en la homeostasis del calcio es una característica prominente en la transición de la hipertrofia compensada al fallo cardíaco, causando disfunción contráctil y el desarrollo de arritmias. La inhibición de SERCA es la principal causa de la desregulación en la señalización del calcio, siendo su expresión necesaria para la adaptación del corazón a la sobrecarga por presión (Frank et al. 2003). SERCA2 transporta calcio hacia el lumen del retículo durante la relajación de los cardiomiocitos, y es fundamental para la contractilidad cardíaca, por lo que la disminución en los niveles y actividad de SERCA2 constituye un hecho clave en el remodelado patológico que desemboca en fallo cardíaco (Zarain-Herzberg 2006).

El **fallo cardíaco congestivo** ocurre finalmente como resultado de las alteraciones que sufre el corazón, tras el proceso adaptativo del sistema cardiovascular que intenta corregir el menor aporte de sangre al organismo. Además de su asociación con la hipertrofia patológica, está ligado a un desequilibrio entre una liberación disminuida de vasodilatadores, como óxido nítrico, y una elevada producción de vasoconstrictores como endotelina (Sutsch et al. 1999). Además, el fallo cardíaco está caracterizado por alteraciones en el metabolismo energético, que incluyen la disfunción mitocondrial y una reducción de la tasa de oxidación de ácidos

grasos, parcialmente compensada por un aumento en la utilización de glucosa. Estos cambios desembocan en la incapacidad del corazón para convertir la energía química en trabajo mecánico (van Bilsen et al. 2009).

5.2. Implicaciones de los GPCRs en la función cardíaca

Los GPCRs median un gran número de eventos en la función cardiovascular. La activación de receptores α - y β -adrenérgicos, muscarínicos, de angiotensina II o endotelina es central en la contractilidad cardíaca, resistencia vascular, desarrollo del sistema cardiovascular y el crecimiento y remodelado cardíaco (Penela et al. 2006).

Los GPCRs cardíacos incluyen los receptores de catecolaminas α - y β -adrenérgicos (α AR y β AR), receptores de endotelina ET_A R y ET_B R, receptores de angiotensina II AT_1 R y AT_2 R, receptores de adenosina A_1 R y A_2 R y receptores muscarínicos de acetilcolina. Entre ellos, los sistemas más estudiados son los receptores adrenérgicos α_1 y β_1 , ET_A y AT_1 (Kang et al. 2007) (**figura I-8**).

Cuando el corazón empieza a fallar, el organismo intenta mantener una perfusión constante aumentando la estimulación simpática por medio de un incremento en los niveles de las catecolaminas circulantes, y de determinados mediadores neurohormonales como la angiotensina II, endotelina y péptidos natriuréticos, para ajustar el ritmo cardíaco y la fuerza contráctil a las necesidades de los tejidos. La estimulación a corto plazo de estos GPCRs media el aumento del ritmo cardíaco y la intensidad de la contracción, así como la retención de líquidos, ayudando a mantener el gasto cardíaco y la presión sanguínea sistémica (Mudd et al. 2008).

Sin embargo, la estimulación crónica de estos GPCRs resulta perjudicial, siendo una característica común de la enfermedad cardíaca (Kang et al. 2007), ya que puede promover el remodelado del corazón, incrementando su tamaño, las dimensiones de la cámara, variando la composición tisular y alterando la expresión de determinadas proteínas que controlan la excitabilidad y contractilidad cardíacas (Barry et al. 2008), además de promover eventos apoptóticos e incrementar la demanda metabólica del corazón, cuyas reservas fisiológicas, anatómicas y

bioquímicas son limitadas (Liggett 2005).

Los receptores α_1 y β -adrenérgicos

se expresan en el miocardio y median varios aspectos de la funcionalidad cardíaca tras su estimulación por las catecolaminas epinefrina y norepinefrina. De hecho, el regulador más importante de la función cardíaca es el tono β -adrenérgico, gobernado por la circulación sistémica de

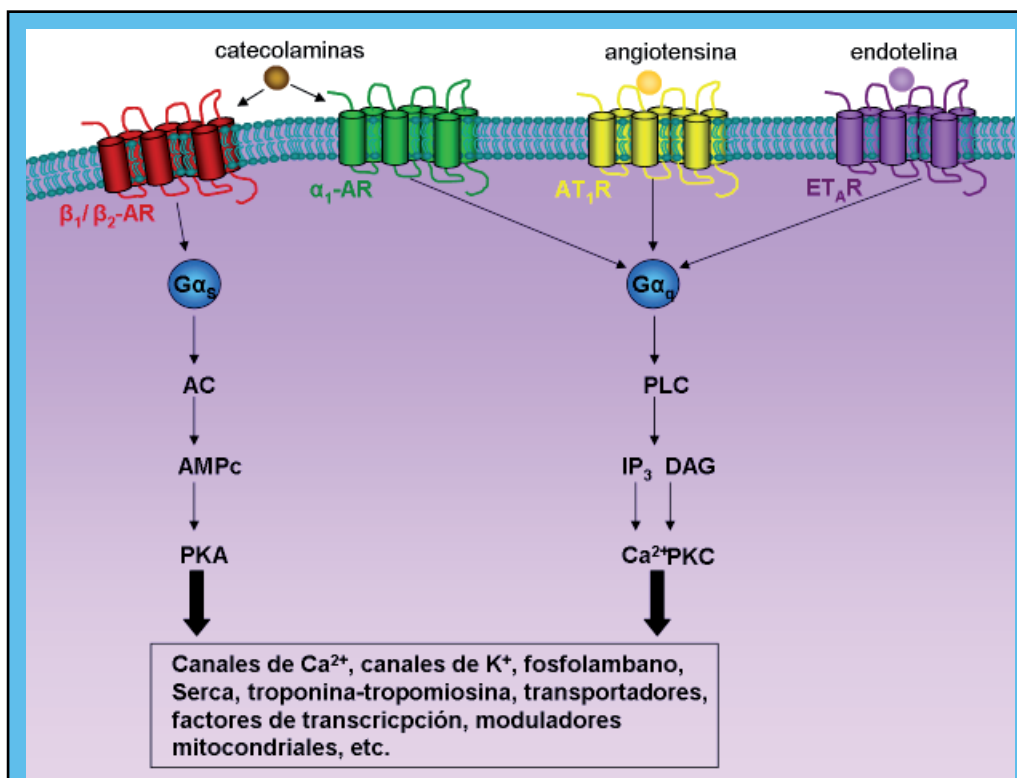


Fig I-8. Principales GPCRs cardíacos. Los receptores β_1 adrenérgicos señalizan fundamentalmente a través de la vía $G\alpha_s$ /adenilato ciclasa/PKA, mientras que los receptores α_1 adrenérgicos, AT_1 y ET_A señalizan a través de la ruta α_q /PLC/PKC.

catecolaminas, que son liberadas por las glándulas adrenales y por neuronas del sistema nervioso simpático en respuesta a estrés físico o mental (Matkovich et al. 2006), y que están elevadas en la sangre de pacientes con fallo cardíaco (Keys et al. 2004).

Se han descrito tres tipos de receptores β -adrenérgicos: β_1 , β_2 y β_3 , siendo el primero el más abundante en el corazón humano, ya que constituye el 75% del total del número de receptores (Keys et al. 2004).

La activación de los receptores β -adrenérgicos promueve la activación de la vía $G_q/AC/PKA$ y un efecto ionotrópico positivo en el corazón, con un aumento en el ritmo, la contractilidad y gasto cardíaco. En algunas condiciones, β_2AR puede también acoplarse a G_i (Matkovich et al. 2006).

Los receptores α_1AR se acoplan a G_q al igual que GPCRs implicados en el crecimiento de miocitos y respuesta hipertrófica, como los receptores de angiotensina II y endotelina I. No está claro el papel exacto de α_1AR en el corazón, pero parece que puede estar implicado en la hipertrofia miocárdica (Koch et al. 2000). La activación de los receptores α -adrenérgicos a nivel vascular favorece la contracción de la musculatura lisa, limitando la perfusión a áreas no críticas del organismo (Liggett 2005).

En cuanto a **los receptores de angiotensina II**, se han descrito 4 familias: AT_1 , la mejor estudiada por ser la principal en el adulto, AT_2 , AT_3 y AT_4 .

Los receptores de angiotensina AT_1R median vasoconstricción, contractilidad cardíaca, formación de matriz extracelular e hipertrofia cardíaca a través de la vía $G_{q/11}$ o $G_{ai/o}$ (Higuchi et al. 2007). De los receptores AT_1R , ha sido ampliamente estudiado el subtipo $AT_{1A}R$, que promueve la activación de ERK1/2 por dos vías independientes que implican G_q y β -arrestinas (Kim et al. 2005). Además, la señalización angiotensina- G_q -PKC-MAPKs puede promover tanto crecimiento como muerte celular, e induce fibrosis cuando ocurre en fibroblastos (Opie et al. 2006). Así, la presencia de angiotensina II es suficiente para inducir hipertrofia y fallo cardíaco en ratones (Paradis et al. 2000). Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) son tan utilizados como los β -bloqueantes en el tratamiento clínico de la hipertrofia (Barry et al. 2008). Sin embargo,

ratones deficientes en angiotensina II siguen desarrollando hipertrofia por sobrecarga de presión (Harada et al. 1998), lo que sugiere que hay otros factores implicados. También se ha descrito que los receptores de angiotensina pueden activarse por estímulos mecánicos (Opie et al. 2006).

Por último, **el receptor de endotelina** $ET_A R$, que también señala acoplado a G_q (Kang et al. 2007), causa vasoconstricción y su estimulación prolongada puede conducir a hipertensión e hipertrofia (Morris et al. 2010).

5.3. Programa génico fetal

Uno de los principales cambios moleculares en el remodelado cardíaco es la reactivación del programa fetal, una serie de genes que normalmente sólo se expresan en el corazón durante el desarrollo y están reprimidos en el miocardio adulto. La reinducción del programa génico fetal está asociada con hipertrofia patológica excéntrica o concéntrica, mientras que en la hipertrofia fisiológica no tiene lugar (Barry et al. 2008).

Estos genes codifican, entre otros, para la **cadena pesada de β -miosina** (β -MHC), la **actina α -esquelética** (α -ACT) y los **péptidos natriuréticos** atrial y cerebral (ANP y BNP). Estos últimos afectan al sistema cardiovascular por sus acciones de diuresis, natriuresis, vasodilatación e inhibición del eje aldosterona-renina (Nishikimi et al. 2006), y su función principal en el miocardio es inhibir la respuesta hipertrófica (Gardner 2003).

En la hipertrofia patológica, además de inducirse estos genes embrionarios se reprimen otros específicos del músculo cardíaco adulto como SERCA y la cadena pesada de la α -miosina (α -MHC). De hecho, un aumento en el ratio β -MHC/ α -MHC está asociado con patología (Mahdavi et al. 1984; Izumo et al. 1987), ya que cada isoforma tiene una actividad catalítica distinta e influyen de distinta manera a la función cardíaca. En cambio, en el crecimiento fisiológico del corazón los niveles de α -MHC y SERCA están aumentados, mientras que α -ACT, β MHC, ANP, o BNP no están alterados sustancialmente (Jeong et al. 2005).

5.4. La vía de la insulina en la función cardíaca

El principal papel de la insulina en el corazón en condiciones fisiológicas es la regulación de la utilización de sustratos energéticos.

El receptor de insulina activado fosforila a miembros de la familia IRS y Shc, lo que conduce a la activación de dos vías principales: la vía de **ERK**, principalmente implicada en crecimiento celular y desarrollo, y la vía de **PI3K**, importante en la acción metabólica de la insulina, que conduce a la activación de PKB/Akt por PDK1, y también induce la translocación del GLUT4 a la membrana. Además, la insulina también induce síntesis de proteínas y la captación de ácidos grasos de cadena larga en los cardiomiocitos, que no se utilizan sino que son almacenados intracelularmente (Bertrand et al. 2008).

La vía de insulina es **cardioprotectora**, favorece la utilización de glucosa, más eficiente energéticamente, frente a la oxidación de ácidos grasos, previniendo también la producción de intermediarios tóxicos de los ácidos grasos. Además, la activación de **Akt** estimula a la glucógeno sintasa, a través de la inactivación de la glucógeno sintasa quinasa (GSK3), y promueve otros mecanismos protectores ya que inactiva proteínas proapoptóticas como BAD, BAX y caspasa 9, activa a eNOS, mantiene intacta la estructura mitocondrial, y promueve la síntesis de proteínas contráctiles a través de mTOR, entre otros (Bertrand et al. 2008). Además, puesto que GSK3 está implicada en señalización anti-hipertrófica y anti-

supervivencia en el corazón, su inhibición por Akt promueve la respuesta hipertrófica y favorece la supervivencia (Sugden et al. 2008).

En condiciones patológicas, como en la diabetes tipo II, isquemia miocárdica, e hipertrofia cardíaca, las vías de transducción de señales de la insulina y su acción están alteradas (Bertrand et al. 2008), aunque los fenómenos moleculares que subyacen a estas alteraciones en muchos casos se desconocen. Esta resistencia a insulina, junto con la obesidad y alteraciones metabólicas en el miocardio característicos de la diabetes tipo II son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. De hecho, **el corazón diabético** está caracterizado por una disminución en la captación de glucosa y su oxidación. En cambio, la captación y oxidación de ácidos grasos de cadena larga está aumentada, aunque no lo suficiente para prevenir la acumulación de lípidos en el corazón. Además, la resistencia a la insulina, que consiste en una alteración de la activación de la vía PI3K/Akt inducida por ésta, impide los efectos cardioprotectores de esta vía (Bertrand et al. 2008).

En conclusión, a pesar de todos los avances realizados en el conocimiento del funcionamiento fisio-patológico del corazón, muchas son aún las incógnitas referentes a los mecanismos moleculares que subyacen a este funcionamiento y su estudio resulta complejo, debido al gran intrincamiento característico de las vías de señalización celular.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es **profundizar en el conocimiento de las funciones no canónicas de las GRKs**, particularmente sus interacciones funcionales con proteínas MAPK, y emplear el modelo murino GRK2+/- para analizar la influencia de los niveles de GRK2 sobre la fisio-patología cardíaca.

1. Dado que resultados preliminares del laboratorio mostraban que GRK5 interacciona con la subunidad $G\alpha_{12}$ de las proteínas G heterotriméricas, nuestro primer objetivo fue **profundizar en el estudio de la modulación de $G\alpha_{12}$ por GRK5** analizando a nivel molecular esta interacción y los posibles efectos de GRK5 sobre procesos celulares dependientes de $G\alpha_{12}$.

2. Al comienzo de esta tesis publicamos un trabajo que demuestra que GRK2 fosforila a p38, afectando tanto a su activación como a su actividad. Por ello, nuestro segundo objetivo fue **avanzar en la caracterización de la interacción funcional entre GRK2 y p38**, tanto a nivel molecular como en la búsqueda de procesos celulares en los que esta fosforilación estuviera implicada, y determinar qué estímulos pueden promover la fosforilación de p38 en la treonina 123.

3. GRK2 es capaz de reducir la activación de ERK por quimioquinas a nivel de la interfase MEK/ERK, pero se desconocía el mecanismo molecular por el que se ejercía este efecto. Nuestro tercer objetivo fue por tanto **profundizar en el estudio de la modulación de la ruta MEK/ERK por GRK2** a nivel molecular.

4. Por último, y como se ha descrito en la introducción, se ha propuesto que la inhibición de GRK2, cuyos niveles están aumentados en diferentes cardiopatías, podría ser beneficiosa como tratamiento para la disfunción cardíaca. Por ello, nuestro cuarto objetivo se centró en **analizar el efecto de la disminución de los niveles de GRK2 a largo plazo y a nivel sistémico en la patofisiología cardíaca, empleando el modelo murino de hemicigotos GRK2+/-**, estudiando con particular atención sus efectos sobre diferentes rutas de señalización celular importantes en el corazón.

Materiales y Métodos

1. REACTIVOS

Todos los productos empleados son de grado analítico. Cloruros sódico, cálcico, amónico, magnésico, fosfatos sódico y potásico, carbonato sódico, hidróxido sódico, acetato sódico, Tris, formaldehído, paraformaldehído, glicina, glutamina, ácido clorhídrico, metanol, etanol y glicerol fueron suministrados por Merck. PMSF, benzamidina y albúmina de suero (BSA) fueron suministrados por Boehringer Mannheim.

La mezcla de inhibidores de fosfatasa PhosSTOP es de Roche. El inhibidor de serín-treonín fosfatasa Caliculina A es de Cell Signaling. El β -Glicerofosfato fue suministrado por Fluka.

TEMED, SDS, persulfato amónico, azul de bromofenol, patrones proteicos de peso molecular conocido, papel de nitrocelulosa y reactivo de Bradford se obtuvieron de Bio-Rad. Lipofectamina/Plus, OptiMem y RNase away son de Invitrogen. Fluoruro sódico, EDTA, β -mercaptoetanol, carbacol, ortovanadato sódico, DMSO, rojo Ponceau, Tritón X-100, deoxicolato sódico, SDS, Tween-20, aprotinina, azida sódica, pirofosfato sódico, ácido lisofosfatídico (LPA), isoproterenol, endotelina, esfingosina-1-fosfato, rojo aceite (oil red), dexametasona, insulina, IBMX, ONPG, cisplatino, doxorubicina, trombina, caliculina, PMA, TGF β , PDGF, SB202190, SKF-86002, albúmina libre de IgG, fibronectina, tioglicolato, agua libre de RNAsas y proteína G-sefaraosa son de Sigma.

Phospho Blocker es de Cell Biolabs. CCL2 (MCP1) es de R&D Systems. MBS y sulfo-MBS fueron suministrados por Pierce. El Adyuvante Completo e Incompleto de Freund y el hEGF son de Chemicon. La hemocianina (HKL), el PD98059 y el SB203580 son de Calbiochem.

Todos los demás reactivos empleados fueron de calidad analítica suministrados por casas comerciales contrastadas.

2. ÁCIDOS NUCLEICOS

2.1. Plásmidos y construcciones

2.1.1. GRKs

Las construcciones pCDNA3-GRK2 bovina, pCDNA3-GRK2-K220R bovina, pCDNA3-Myc-GRK5 humana y la construcción pCDNA3-HA-RH que contiene

los aminoácidos 1-183 N-terminales de GRK5 fueron cedidas por el laboratorio del Dr. J. L. Benovic de la Universidad Thomas Jefferson en Filadelfia, EEUU.

Los mutantes pCDNA3-Myc-GRK5 S114A y pCDNA3-Myc-GRK5 S114D fueron generados por la Dra. Sandra Peregrín en el laboratorio. Los mutantes GRK2 S670A y S670D también fueron generados por nuestro grupo (Elorza et al. 2000; Jimenez-Sainz et al. 2006).

El mutante pCDNA3-Myc-GRK5 K215R fue generado siguiendo la estrategia de mutagénesis descrita más adelante a partir de la construcción pCDNA3-Myc-GRK5.

Los mutantes pCDNA3-HA-RH-GRK5 S114A y pCDNA3-HA-RH-GRK5 S114D fueron también generados por mutagénesis dirigida a partir de la construcción silvestre como se describe más abajo.

2.1.2. $G\alpha$

El plásmido pCDNA- $G\alpha_{12}$ Q229L proviene de la Colección Americana de Tipos Celulares (ATCC: <http://www.atcc.com/>). pCDNA3- $G\alpha_{12}$ WT procede del "cDNA UMR Resource Center University of Missouri-Rolla Rolla" (USA) (<http://www.cdna.org/>). pCDNA3- $G\alpha_{13}$ WT y pCDNA3- $G\alpha_{13}$ Q226L fueron proporcionadas por los Drs. A. Aragay y M. Simon, Caltech, Pasadena, CA (USA) y por el instituto Guthrie (<http://www.guthrie.org/>). Los plásmidos de expresión para las subunidades β_1 y γ_2 (ambos en pCEFL) fueron cedidas amablemente por el Dr. Silvio J. Gutkind, NIH, Bethesda, Maryland, USA.

2.1.3. MKK6 y p38

El mutante constitutivamente activo pCDNA3-MKK6_{CAM} fue proporcionado por el Dr. J. M. Redondo, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid. Asimismo nos facilitó la construcción pCDNA3-Flag-p38 α de ratón. En el laboratorio se han elaborado construcciones de p38 α de ratón mutadas en el residuo fosforilado por GRK2: T123A (impide la fosforilación por GRK2) y T123D (la imita) mediante el kit de mutagénesis dirigida "QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit" de Stratagene (ver más abajo).

2.1.4. Otros

El vector vacío pCDNA3 se obtuvo de Invitrogen. pCEFL-RhoA QL, pCEFL-hGFP, pGL3-SRE-LUC, pCDNA3- β Galactosidasa y los plásmidos de expresión para los mutantes

constitutivamente activos Src_{CAM} y PKA_{CAM} (subunidad catalítica) fueron cedidos amablemente por el Dr. J. Silvio Gutkind, NIH, Bethesda, Maryland, USA.

El vector pBK-GIT-flag fue cedido por el Dr. R. T. Premont, Duke University Medical Center, Durham, USA.

pCDNA3-HA-MEK1 y la construcción para la expresión del mutante constitutivamente activo HA-MEK D222 proceden del laboratorio del Dr. P. Crespo, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria - Universidad de Cantabria.

pCDNA3-HA-ERK1 fue cedido por el Dr. J. Moscat, Genome Research Institute, University of Cincinnati, USA.

2.2. Generación de mutantes

Para generar los mutantes se empleó el sistema "QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit" de Stratagene.

Se generó Myc-GRK5 K215R a partir de Myc-GRK5 WT. Se emplearon los siguientes oligonucleótidos, generados por la compañía Invitrogen según nuestro diseño:

5'GTAAAATGTATGCCTGCCGCGCTTGGAGAAGAAGAGGATC3', y

5'ATCCTCTTCTTCTCCAAGCGCCGGCAGGCATACATTTTAC 3' (reverso).

Se generó HA-RH-GRK5 S114A y HA-RH-GRK5 S114D y a partir de HA-RH-GRK5 con los oligonucleótidos:

-mutación S114D:

5'CCAAAGGACCTGTTTT CATAGCCCAA 3', y

5'AACAGGGTCCTTTGGGGTGAGGTACTT 3' (reverso).

-mutación S114A:

5' CACCCCAAAGGCCCTGTTTTCATAGC CCAAG 3', y

5' CTTGGGCTATGAAAACAGGGGCCTTT GGGGTG 3' (reverso).

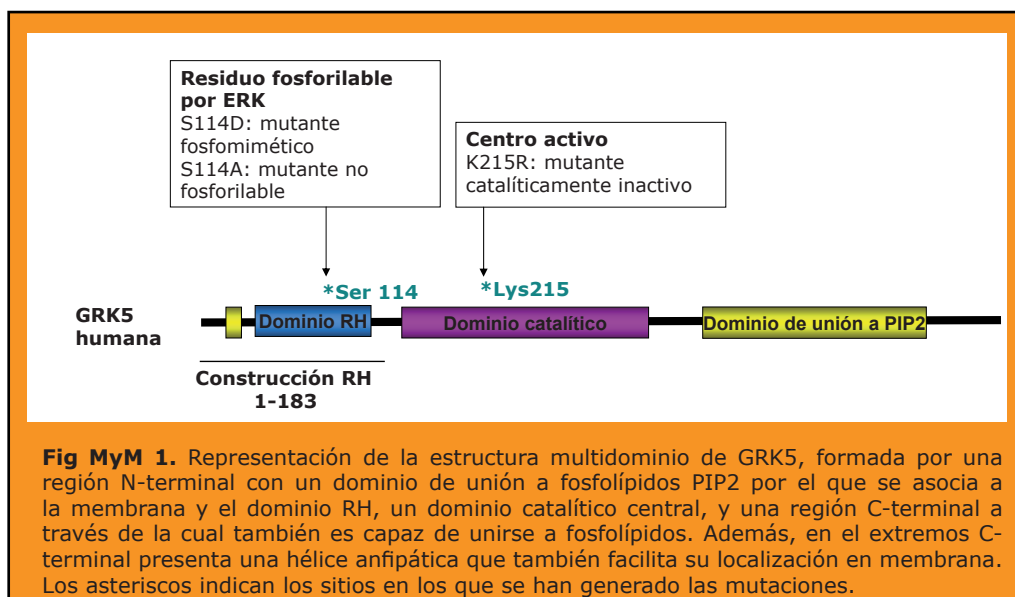


Fig MyM 1. Representación de la estructura multidominio de GRK5, formada por una región N-terminal con un dominio de unión a fosfolípidos PIP2 por el que se asocia a la membrana y el dominio RH, un dominio catalítico central, y una región C-terminal a través de la cual también es capaz de unirse a fosfolípidos. Además, en el extremo C-terminal presenta una hélice anfipática que también facilita su localización en membrana. Los asteriscos indican los sitios en los que se han generado las mutaciones.

Para purificar el DNA plasmídico se empleó el kit de "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" de Promega.

En la **figura MyM 1** se puede observar una representación de la estructura de GRK5, y se muestran los residuos donde se han generado las mutaciones así como la composición de la construcción RH-GRK5.

2.3. RNA

2.3.1. Extracción de RNA

Los mRNAs fueron extraídos a partir de porciones de tejido cardíaco embebido en RNA later, de Qiagen, conservados a -70°C. Las muestras fueron homogeneizadas con esferas de acero inoxidable de 3mm de diámetro, de Biometa, empleando el Tissue Lyser de Qiagen a 30 segundos⁻¹ de frecuencia durante 2 minutos.

Para la extracción de RNA de corazón se empleó el kit Fibrous Tissue RNeasy Mini Kit de Qiagen, siguiendo el protocolo del fabricante.

Posteriormente, se analizó la pureza y la concentración del RNA obtenido utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000, de Thermo Scientific. Además, se analizó la calidad e integridad del RNA empleando el Bioanalizador Agilent 2100, de Agilent.

2.3.2. RT-PCR

Se llevaron a cabo por el Servicio de Genómica del CBMSO, utilizando un equipo Light Cycler de Roche.

Se emplearon sondas comerciales "Taqman Gene Expression Assays" para

SERCA2 (Mm01201431_m1), Egr1 (Mm00656724_m1), Egr3 (Mm00516979_m1), α -actina esquelética (Mm00808218_g1), α -actina cardíaca (Mm01333821_m1) y cardiotrofina 1 (Mm_00432772_m1), todas ellas de ratón, con las condiciones indicadas por Applied Biosystems.

Para analizar la expresión de BNP, se utilizaron dos sondas diseñadas por nosotros, generadas por Invitrogen, cuyas secuencias son:

-oligonucleótido sentido:

GTCAGTCGTTTGGGCTGTAAC

-oligonucleótido antisentido:

AGACCCAGGCAGAGTCAGAA

Y cuyas condiciones óptimas para la PCR son:

-Denaturalización 95°, Hold time 600sec, Slope 20°C/sec, 1 ciclo.

-Amplificación 95°, 20sec, 20°/sec. 58°, 20sec, 20°/sec. 72°, 20sec, 20°/sec. 45ciclos.

-Melting 95°, 0 sec, 20°/sec. 65°, 15sec, 20°/sec. 95°, 0sec, 0,1°/sec. 1ciclo.

-Cooling 40°C, 30sec, 20°/sec, 1 ciclo.

2.3.3. Microarrays

Para comparar la expresión génica en corazón de ratones GRK2+/- y GRK2+/+ de 4, 9 y 15 meses de edad, se realizó un análisis de la expresión génica con Microarrays de Affymetrix chips 430 2.0 de ratón (Genechip® Mouse Genome 430 2.0 Array), que contienen 39.000 transcritos, en el Servicio de Genómica de CNB (<http://www.cnb.uam.es/~genomica>). El material de partida fue RNA extraído de corazón como se ha descrito anteriormente, 3 ratones por condición.

El análisis bioinformático se realizó mediante la aplicación de los algoritmos estadísticos más apropiados (LiMMA) y los resultados se analizaron mediante el visualizador FIESTA y el software Researcher's Digest (Triviño J.C. 2007) desarrollados en el Centro Nacional de Biotecnología (<http://bioinfogp.cnb.csic.es>), así como empleando el software Multiexperiment Viewer.

En primer lugar, para analizar las diferencias de expresión a cada edad, se realizó el análisis con el visualizador Fiesta seleccionando los genes con $FDR < 0,2$ y $Fold\ Change > 1.5$ o < -1.5 . Se realizaron mapas de calor para comprobar la reproducibilidad entre los 3 ratones por condición, y también

se organizaron estos genes en base a su nombre con el programa Researcher's Digest.

En segundo lugar, para realizar el análisis de los patrones de expresión génica con el envejecimiento, se creó un documento Excell con las columnas: ProbeID/ Gene Symbol-Title/ M4meses/ M9meses/ FDR4meses/ FDR9meses, donde $M = \log\text{RATIO}$. Para filtrar los patrones planos, se creó columna una nueva columna llamada $RMS = \frac{RAIZ(M4meses \times M4meses + M9meses \times M9meses)}{2}$, y se seleccionaron los RMS mayores de 0,34 (con MRS menores, todos los M están entre -0,59 y 0,59, que equivale a una tasa de cambio de entre -1.5 y 1.5). Se eliminaron además los genes en los que en ninguna de las edades había diferencia significativa entre los animales GRK2+/+ y GRK2+/- (considerando significativo que se diera un $FDR < 0.2$ y además que $M > 0.59$ ó > 0.59). El archivo resultante fue analizado empleando el software Multiexperiment Viewer.

Se clasificaron los genes en los que se hallaron cambios significativos según su función celular, en base a la información contenida principalmente en la base de datos Entrez Genes/Gene Ontology.

3. CULTIVOS CELULARES

3.1. Líneas celulares

Se han empleado varias líneas celulares establecidas. Las células HEK293 (epiteliales de riñón embrionario humano) se obtuvieron de Invitrogen. Se crecieron en monocapa en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina 2mM, suero fetal de ternera (FBS) al 8% y una mezcla de antibióticos (50µg/ml gentamicina, 0.01% estreptomina y 0.063% penicilina G).

Las células Mono Mac 1 son células monocíticas humanas, que se obtuvieron de la ATCC. Se crecen en suspensión en RPMI suplementado con FBS al 10%, aminoácidos no esenciales, Glutamina, Piruvato sódico y antibióticos.

La línea celular de fibroblastos preadipocíticos 3T3-L1, procedente de la ATCC, se mantiene en adherencia en medio DMEM suplementado con glutamina y

antibióticos y con 10% de suero de ternera neonatal (NCS).

Las células 3T3-NIH son fibroblastos murinos que se cultivan en DMEM 10% NCS suplementado con glutamina y antibióticos, y fueron cedidas por el Dr. J. Silvio Gutkind.

El resto de las líneas utilizadas proceden de la ATCC (www.atcc.org).

Las células Cos7 son células adherentes de riñón de mono verde africano transformadas por SV-40, y crecen en DMEM 10% FCS suplementado con glutamina y antibióticos.

Las células H9c2 son mioblastos de rata y crecen en DMEM modificado (4,5g glucosa/l y 1,5g bicarbonato sódico/l) suplementado con glutamina, antibióticos y 10% de FBS.

Las células MCF7 y MDA-MB-468 son epiteliales, procedentes ambas de adenocarcinomas de glándula mamaria humanos metastatizados en el espacio pleural. Crecen en adherencia en DMEM suplementado con glutamina, antibióticos y 10% FBS.

Las células 184B5 y MCF10A son células epiteliales de glándula mamaria humana sana, inmortalizadas pero no malignas. Crecen en medio MEGM de Clonetics, consistente en un medio basal suplementado con BPE, hEGF, hidrocloruro, GA1000, insulina y suero de caballo al 5%.

Las células U87 son células adherentes, procedentes de astrocitoma humano, y crecen en DMEM suplementado con glutamina, antibióticos y 10% FBS.

En todos los casos las células se mantienen en incubadores a temperatura constante de 37°C y atmósfera controlada de CO₂ al 5%.

La comparación entre los tipos celulares A431, Jurkat, A549, A637, Hela, MCF7, BJAB, HL-60, K56 y HvT78 se realizó empleando una membrana de nitrocelulosa comercial cargada con lisados de estas células denominada Cruz Blot A, de Santa Cruz Biotechnology.

3.2. Transfecciones

Las transfecciones transitorias de las células HEK293, NIH3T3, Cos7 y 3T3L1 se llevaron a cabo en placas P-100, P60 o p24 a una confluencia de 70-80% con Lipofectamina/Plus y Optimem de Invitrogen. Las células son sembradas el día previo a la transfección a una concentración adecuada

según el tipo celular (HEK293 1x10⁶ células/placa p60). Las transfecciones se realizaron siguiendo los protocolos que establece el producto.

3.3. Tratamientos celulares

Los tratamientos se realizaron 24 o 48h después de la transfección, en su caso, o 24h después de su siembra si las células no fueron transfectadas. Las células se sometieron a ayuno durante 6-16h. Tras la estimulación con los distintos agentes se lavaron las células en tampón fosfato salino (PBS) para su posterior lisis.

Las células H9c2 fueron estimuladas con isoproterenol 10μM durante 8 minutos, endotelina 10nM durante 15 minutos, doxorubicina 5μM durante 20 minutos o angiotensina II 100nM durante 30 minutos.

Las células Cos7 con una mezcla de varios ligandos de diferente naturaleza que incluía esfingosina-1-fosfato (S1P) 2,5μM + ácido liso-fosfatídico (LPA) 10μM + trombina 5U + Isoproterenol 3,6μg/ml, o PMA 100μM durante 10 minutos. El tratamiento con el inhibidor de fosfatasas Caliculina 10μM se realizó 30 minutos antes del estímulo.

Las células MCF7 se estimularon con los mismos compuestos utilizados para las Cos7, y además fibronectina (recubriendo el pocillo de manera previa a la siembra de las células), Doxorubicina 0,2μM 1h y Cisplatino 50μM 20 minutos.

Las células 3T3m1 fueron estimuladas con carbacol 100μM 5 minutos, S1P 2,5μM 10 minutos, TGFβ 10ng/ml 20 minutos o PDGF 20ng/μl durante 30 minutos.

Las células U87 fueron estimuladas con CCL2 (MCP1) 10nM durante 10 minutos.

3.4. Diferenciación de adipocitos

La diferenciación de los fibroblastos de ratón 3T3L1 a células adipocíticas se llevó a cabo como se describe en la bibliografía (Green et al. 1975; Engelman et al. 1998; Engelman et al. 1999). Se cultivaron las células hasta su confluencia y se plaquearon, en flask o en p24 con cristales pre-incubados en poli-L-lisina a 10 μg/ml durante 20 minutos, en medio DMEM suplementado con antibióticos, glutamina, biotina 4μM (Sigma) y 10% suero FBS-AXC (Anion Exchange Resin/Charcoal-treated Serum, proporcionado por el servicio de cocinas del Instituto de

Investigaciones Biomédicas). El día de plaqueo es considerado día -4 del proceso de diferenciación. El día -3 las células están al 80% de confluencia y se transfectan con Lipofectamina 2000. El día -1 se cambia el medio por medio fresco. El día 0 se cambia el medio por DMEM con 10% FBS-AXC, 3-isobutil-1-metilxantina 0.5mM (IBMX de Sigma), dexametasona 0.5 μ M (Sigma) e insulina 1 μ M (Sigma). A partir del día 3, se cambia el medio cada dos días utilizando DMEM con 10% FBS-AXC, biotina 4 μ M e insulina 1 μ M. A partir del día 6 se analiza la diferenciación mediante tinción con Oil Red (Sigma), que tiñe las gotas lipídicas que los adipocitos acumulan en su citoplasma (**figura**

lavadas con PBS y sometidas a lisis para su posterior procesamiento. El volumen de lisis es de 1ml para una placa p100, o un volumen escalado según la superficie para placas o pocillos de menor tamaño.

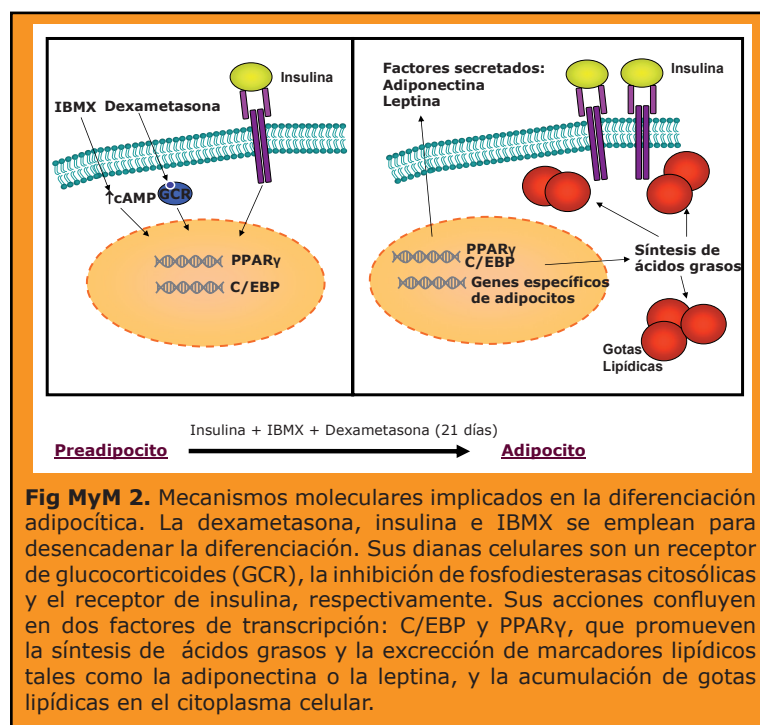
Para la lisis, se añade el tampón de lisis y se incuban las placas sobre hielo 30min. Posteriormente se levantan las células con un rascador y se clarifican los lisados centrifugando durante 10 minutos a 4°C.

En los experimentos de coimmunoprecipitación de GRK5 con Ga_{12/13} se empleó un tampón de lisis cuya composición fue NaCl 300mM, Tris HCl pH 7,5 10mM, Tritón X100 1%, DOC 1%, SDS 1%, PMSF 0,2mM, NaF 10mM, Benzamidina 1mM, Aprotinina 10 μ g/ml, Na3VO4 0.2mM, β -glicerofosfato 25mM y NaPPI 5mM.

Para los experimentos de coimmunoprecipitación de GRK2 y MEK se empleó un tampón compuesto por NaCl 250mM, Tris HCl pH 7,5 10mM, Tritón X100 1%, DOC 0,3%, SDS 0,1%, PMSF 100mM, NaF 500mM, Benzamidina 1mM, Aprotinina 10 μ g/ml y Na3VO4 0.2mM.

Para la inmunoprecipitación de p38 o de MEK endógena se utilizó un tapón de lisis con Tris HCl pH 7,5 20mM, NaCl 200mM, EDTA 1mM, Tritón X100 0.5%, PMSF 1mM y NaF 10mM, Benzamidina 1mM, Aprotinina 10 μ g/ml y Na3VO4 0.2mM.

En la lisis de células MCF7, Cos7, NIH3T3m1, MDA-MB468, MCF10A y 184B5 se utilizó un tampón compuesto por Tris pH 7,5 20mM, Tx100 1%, Glicerol 10%, NaCl 137mM, EDTA 0,5mM, PMSF 100mM, Benzamidina 1mM, Aprotinina 10 μ g/ml y la mezcla comercial de inhibidores de fosfatasa PhosSTOP de Roche.



MyM 2). Se fijan las células con formalina (formaldehído al 3,7%) durante 5 minutos y se lavan con PBS. Se incuban en una solución previamente filtrada 60:40 (v/v) de oil red (disuelto en isopropanol 0.2% p/v) y agua. Se lavan abundantemente las preparaciones y se analizan al microscopio. Cuando se realiza además inmunofluorescencia, se procede como se describe más adelante en el apartado de inmunoprotocolos.

3.5. Lisis celular

24-48h después de la transfección, o bien tras los estímulos, las células son

4. MUESTRAS DE PACIENTES

Las muestras de carcinomas ductales de mama de pacientes del Hospital Universitario de La Paz se disgregaron mecánicamente en un mortero con N₂ líquido para su posterior lisis en el tampón NaCl 0,3M, Hepes pH 7,5 20mM, EDTA 0,1mM, CHAPS 2%, glicerol

10%, DTT 1mM, ortovanadato sódico 1mM, NaF 5mM e inhibidores de proteasas. Seguidamente se sonicaron a 4°C y los lisados se clarificaron por centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

Las muestras de pacientes con síndrome metabólico fueron cedidas por el Dr. Guillermo Zalba, del C.I.M.A (Universidad de Navarra). Las células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas de muestras de sangre con el método Lymphoprep, que consigue un enriquecimiento en linfocitos y monocitos del 99%. Estas células fueron homogeneizadas en un tampón de lisis compuesto por Tris-HCl pH 7.4 10 mmol/l, EDTA 5 mmol/l, KCl 150 mmol/l, NP-40 0.5% y la mezcla comercial de inhibidores de proteasas Complete (Roche).

5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la determinación de la concentración de proteínas de las distintas muestras se empleó el método de Bradford (Bradford 1976), utilizando albúmina de suero bovino para construir la recta patrón.

6. ELECTROFORESIS

Para separar proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS según el método descrito por Laemmli (Laemmli 1970), cuyos porcentajes de poliacrilamida/bisacrilamida oscilan entre 6 y 12% en función de la resolución requerida. Como patrones de peso molecular se empleó la mezcla de Precision Plus Protein Standards Dual Color de BIO-RAD. A los lisados se les añade tampón de ruptura 4x, y seguidamente las muestras se hierven durante 5 minutos, de manera previa a la carga en los geles para la electroforesis.

Para analizar muestras de DNA, se emplearon geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio 0.5 µg/ml.

7. ANTICUERPOS

7.1. Anticuerpos comerciales

Los anticuerpos primarios se diluyen en TBS-Tween20 al 0.2%, azida sódica 0,02% y BSA 1-5% para los inmunoblots, en solución de bloqueo en las inmunofluorescencias, o se añaden al tampón de lisis en las inmunoprecipitaciones.

Los anticuerpos secundarios se diluyen en TBS-Tween20 al 0.2% para los inmunoblots, y en solución de bloqueo en las inmunofluorescencias.

En las **tablas MyM1 y MyM2** se resumen los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, respectivamente.

7.2. Generación de fosfoanticuerpos policlonales anti P-T123 p38

Se han generado una serie de anticuerpos dirigidos contra el residuo de p38 fosforilado por GRK2, que se encuentra a la entrada del surco de anclaje de p38 (ver **figura MyM 3**).

7.2.1. Fosfoanticuerpo de Pacific Immunology

El fosfo-anticuerpo policlonal de conejo anti-p38 fosforilado en la T123 "Pacific Immunology" fue generado contra un fosfo-péptido acoplado a KLH y posteriormente purificado por cromatografía de afinidad en un doble paso de columnas de afinidad por la compañía Pacific Immunology Corp, CA.

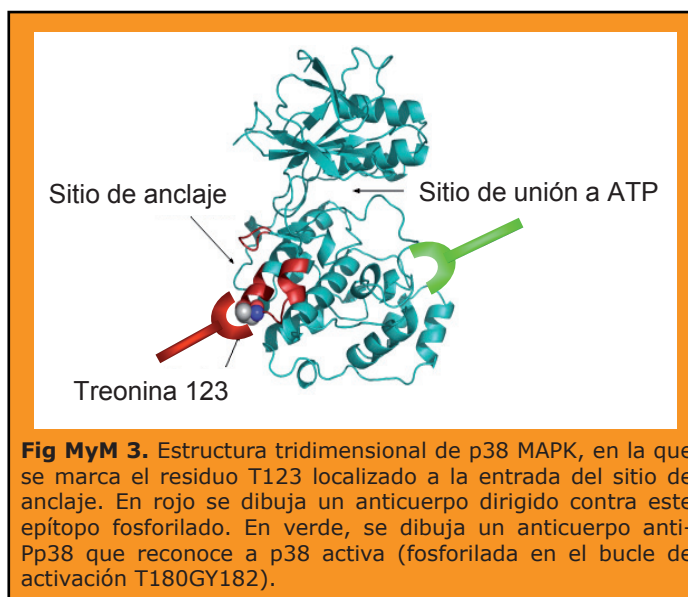
La concentración de proteínas es de 115,32 mg/ml para el suero, y de 0,22 mg/ml para el suero purificado.

7.2.2. Fosfoanticuerpos policlonales de conejo (sueros 462-469)

El proceso que se describe a continuación está esquematizado en la **figura MyM 4**.

Para generar en el laboratorio los anticuerpos policlonales contra el epítipo fosforilado de p38 por GRK2, en primer lugar se llevó a cabo el acoplamiento de un fosfopéptido de 14 aminoácidos (QKLpTDDHVQFLIYC) a hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH, por Keyhole Limpet Hemocianin).

Se llevó a cabo la activación del



KLH con éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS). Para ello se disolvieron 20mg de KLH en 275µl de tampón fosfato sódico 10mM pH 7.5, y se añadieron 425µl de MBS (3mg/ml en dimetil formamida). Se sometió la mezcla a microagitación a temperatura ambiente durante 30 minutos, tras lo que se dializó en tampón fosfato sódico pH 7,2 0,01M durante

16 horas para eliminar el MBS libre (314Da).

Por otro lado se pesaron 20mg del fosfo-péptido, y se disolvieron en dimetil formamida: agua 50:50 en un volumen final de 300µl. A continuación se añadió tampón fosfato sódico pH 7 10mM hasta una concentración final de péptido de 20mg/ml. A continuación se realizó la mezcla del péptido con el conjugado MBS-KLH, que se microagitó durante 3 horas a temperatura ambiente, y se añadió tampón fosfato sódico pH 7 10mM hasta un volumen final de 10ml.

Antes de la inmunización, se realizó una comprobación por Bradford y un ELISA. Para el ELISA, se sembró por duplicado en una en placa de 96 pocillos 0,1µg /1µg /5µg del fosfopéptido, 0,1µg/1µg/5µg de KLH-fosfopéptido, 0,1µg/1µg/5µg de KLH y 5 µg de BSA en un volumen final de 125µl de PBS. Se incubó la placa durante 16 horas a 37°C, tras lo que se realizó un bloqueo con 150µl de PBS 3% BSA durante una hora a 37°C. Se incubaron los pocillos con el anticuerpo purificado generado por Pacific Immunology 1:50 en PBS Tween

0.05% BSA1% durante 1 hora a 37°C, tras lo que se realizaron 3 lavados con PBS Tween 0.05%. El ELISA se reveló con 50µl/pocillo de GAR-HRP 1:1000 en PBS Tween 0,05% BSA1% durante una hora, 3 lavados y revelado con 150µl de solución OPD en oscuridad durante 15-20 minutos. Por último se determinó la absorbancia a 450 nm. La lectura obtenida fue 1,06 9/1,154/1,144/1,153/1,173/1,639 /0,688/0,655/0,484/0,257.

La mezcla antigénica obte-

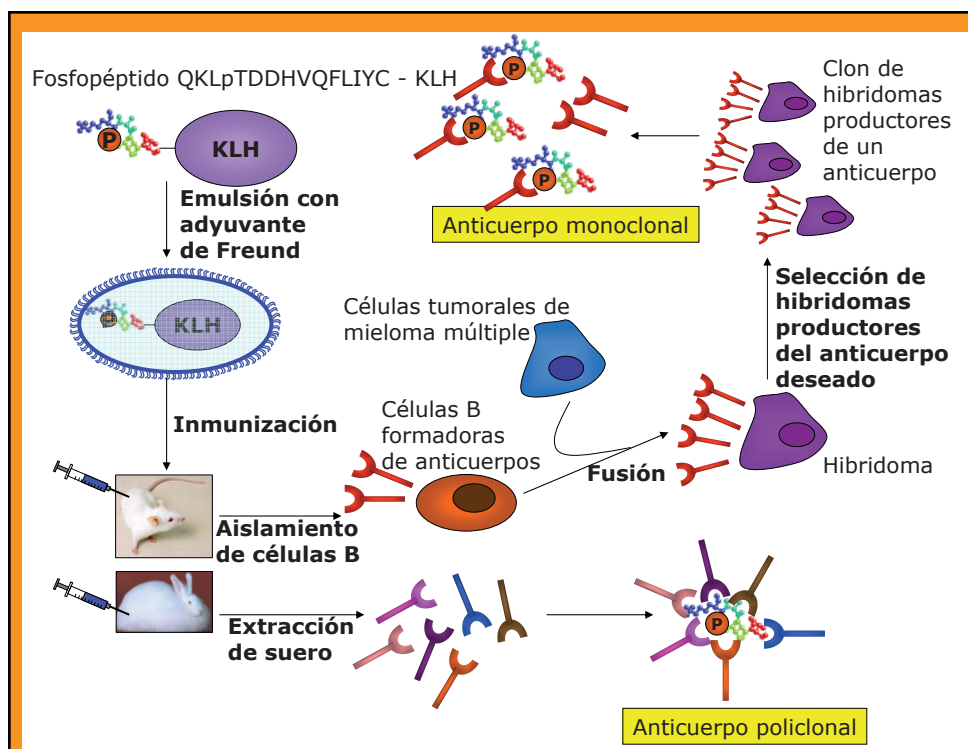


Fig MyM 4. Esquema de la generación de anticuerpos policlonales y monoclonales contra P-T123 p38, siguiendo el protocolo que se describe en el texto. Los anticuerpos policlonales proceden de distintos clones de linfocitos B del conejo, mientras que los monoclonales proceden de un único clon de células B del ratón.

Anticuerpo primario	Antígeno y Pm (KDa)	Péptido inmunogénico	Casa Comercial	Tipo	Uso y dilución
Anti-actina	Actina (45KDa)	PSCT de actina humana	Santa Cruz Biotechnology (#1616)	PCb IgG PA	WB: 1/1000
Anti-AKT	AKT (60KDa)	PSCT de AKT murina	Cell Signalling (#9272)	PC IgG PA	WB:1/1000
Anti-caspasa3	Caspasa3 completa(35KDa) y fragmento tras el corte (17KDa)	FPS el sitio de corte de caspasa 3 humana	Cell Signalling (#9662)	PC IgG PA	WB: 1/1000
Anti-ERK 1	ERK1 (44KDa)	PSCT de ERK1 de rata	Santa Cruz Biotechnology (#93)	PC IgG PA	WB:0,75µg/ml
Anti-ERK 2	ERK2 (42KDa)	PSCT de ERK2 de rata	Santa Cruz Biotechnology (#154)	PC IgG PA	WB:0,75µg/ml
Anti-flag M2	Flag (0,96KDa)	Octa-péptido FLAG (DYKDDDDK)	Sigma (F3165)	MR IgG1	IF: 1/2000
Anti-flag M2-Agarosa	Flag (0,96KDa)	Octa-péptido FLAG (DYKDDDDK)	Sigma (A2220)	MR acoplado a agarosa	IP: 0,01-0,02µl/µl
Anti-Foxo1	Foxo1 (80KDa)	PSCT de FKHR humana	Santa Cruz Biotechnology (#34890)	PCb IgG PA	WB:1/1000
Anti-GIT	GIT1 (84KDa)	Aminoácidos 471-640 de la región interna de GIT1 de origen humano	Santa Cruz Biotechnology (#13961)	PC IgG PA	WB:1/1000
Anti-GRK2	GRK2 (80KDa)	PSCT de GRK2 humana	Santa Cruz Biotechnology (#562)	PC IgG PA	WB: 1/1000
Anti-GRK5	GRK5 (65KDa)	PSCT de GRK5 humana	Santa Cruz Biotechnology (#565)	PC IgG PA	WB: 1/1000
Anti- GSK3α/β	GSK3α/β (47KDa)	GSK3α/β recombinante de Xenopus laevis	Santa Cruz Biotechnology (# 56913)	MR IgG2a (clon 1H8)	WB:1/1000
Anti-Gα12	Gα12 (42KDa)	PSNT de Gα12 de ratón	Santa Cruz Biotechnology (#409)	PC IgG PA	WB: 1/1000
Anti-Gα13	Gα13 (42KDa)	PSNT de Gα13 de ratón	Santa Cruz Biotechnology (#410)	PC IgG PA	WB: 1/1000
Anti-HA (12CA5)	Epítipo HA, Secuencia YPYDVDPYA (1,1KDa)	HA derivado de hemaglutinina de Influenza	Hibridoma (clon 12CA5) Servicio de Microscopía Óptica-CBMSO	MR IgG2b	IP:0,003µl/µl
Anti-HA (Y-11)	Epítipo HA, Secuencia YPYDVDPYA (1,1KDa)	Péptido de la región interna de hemaglutinina de Influenza	Santa Cruz Biotechnology (#805)	PC IgG PA	WB: 1/500
Anti-MEK	MEK1 (45KDa)	PSCT de MEK1 de rata	Santa Cruz Biotechnology (#219)	PC IgG PA	WB:1/500 IP:0,005µl/µl
Anti-MKK6	MKK6 (40KDa)	Proteína de fusión MalE-MKK6 humana.	Donado por el Dr. Angel Nebreda, CNIO	PC	WB: 1/1000
Anti-myc	Epítipo myc, Secuencia EQKLISEEDL (1,2KDa)	PSCT de c-Myc de origen humano	Hibridoma (clon 9E10) Servicio de Microscopía Óptica-CBMSO	MR IgG1	IF: 1/1000
Anti-myc agarosa	Epítipo myc, Secuencia EQKLISEEDL (1,2KDa)	PSCT de c-Myc de origen humano	Santa Cruz Biotechnology (#40 AC)	MR unido a agarosa	IP: 0,005-0,01µl/µl

Anticuerpo primario	Antígeno y Pm (KDa)	Péptido inmunogénico	Casa Comercial	Tipo	Uso y dilución
Anti-p38	p38 (42KDa)	PSCT p38α de <i>Xenopus</i> .	Donado por el Dr. Angel Nebreda, CNIO	PC	IP: 0,01μl/μg WB:1/1500
Anti-p38α	p38α MAPK (42KDa)	PSCT de p38α humana.	Cell Signalling (#9218)	PC IgG PA	WB:1/1000
Anti-p38α	p38α MAPK (42KDa)	PSCT de p38 de ratón	Santa Cruz Biotechnology (#728)	PC IgG PA	WB:1/1000
Anti-p38α/β/γ	p38α/β/γ MAPK (42KDa)	Péptido sintético derivado de p38 humana	Cell Signalling (#9212)	PC IgG PA	WB:1/1000
Anti-P-AKT	P-AKT (S473) (60KDa)	FPS el residuo S473 fosforilado de AKT murina	Cell Signalling (#9271)	PC IgG PA	WB:1/1000
Anti-P-ERK1/2	ERK1 (T202/Y204) (44KDa) y ERK2 (T185/Y187) (42KDa)	FPS los residuos Thr202/Tyr204 fosforilados de ERK1 de origen humano	Cell Signalling (#9101)	PC IgG PA	WB: 1/500
Anti-PF2	GRK2 (80KDa)	Proteína de fusión GST-PF2 (aminoácidos 436-689 de GRK2 bovina)	Generado en el laboratorio por la Dra. Crsitina Murga	PC	WB:1/600
Anti-P-Foxo1	P-S256-Foxo 1 (80KDa)	FPS la Ser 256 fosforilada de FKHR humana	Santa Cruz Biotechnology (#101681)	PC IgG PA	WB:1/1000
Anti-P-GSK3α	P-S21-GSK3α (51KDa)	FPS la Ser 256 fosforilada de GSK3α humana	Santa Cruz Biotechnology (#16308)	PCb IgG PA	WB:1/1000
Anti-P-MEK	P-MEK1/2 (S217/221)(45KDa)	FPS los residuos Ser217/Ser221 fosforilados de MEK1/2 humana	Cell Signalling (#9121)	PC IgG PA	WB: 1/1000
Anti-P-p38	P-TGY-p38 MAPK (42KDa)	FPS los residuos T180/Y182 fosforilados de p38 humana	Cell Signalling (#9211)	PC IgG PA	WB: 1/1000
Anti-P-p38	P-TGY-p38 MAPK (42KDa)	FPS los residuos T180/Y182 fosforilados de p38 humana	Cell Signalling (#9215)	MC IgG	WB: 1/100
Anti-P-RKIP	P-RKIP (S153) (23KDa)	FPS la Ser 153 fosforilada de RKIP de origen humano.	Santa Cruz Biotechnology (#32623-R)	PC IgG PA	WB: 1/1000
Anti-P-S670 GRK2	P-GRK2 (S670)	FPS el residuo S670 fosforilado de GRK2 humana	Invitrogen #44-202	PC IgG PA	WB: 1/1000
Anti-P-Ser-IRS1	P-IRS1 (S307) (170KDa)	FPS el residuo Ser307 fosforilado de IRS1, idéntica en ratón, rata, humano y mono	Upstate (Millipore) #07-247	PC IgG PA	WB:1/1000
Anti-P-Tyr-IRS1	P-IRS1 (Y612) (170KDa)	FPS el residuo Tyr612 fosforilado de IRS1, idéntica en ratón, rata, humano y pollo	Upstate (Millipore) #07-846	PA IgG PA	WB:1/1000
Anti-RKIP	RKIP (23KDa)	Aminoácidos 1-187 de RKIP humana	Santa Cruz Biotechnology (#28837)	PC IgG PA	WB: 1/1000
Anti-β-arrestina 1/2	β-arrestina 1/2 (55KDa)	Proteína de fusión GST-β-arrestina1	Generado en el laboratorio por la Dra. Nila Penela	PC	WB:1/1000

Tabla MyM 1. Anticuerpos primarios utilizados. PSCT=Péptido sintético derivado del extremo C-terminal. PSNT=Péptido sintético derivado del extremo N-terminal. FPS=fosfopéptido sintético derivado de la región que contiene. MR=Monoclonal generado en ratón. MC=Monoclonal generado en conejo. PC=Policlinal generado en conejo. PCb=Policlinal generado en cabra. PA=Purificado por cromatografía de afinidad. WB=western blot. IP: inmunoprecipitación. IF:inmunofluorescencia. Dilución para inmunoprecipitación referida a μl de tampón.

Anticuerpo secundario	Origen y reconocimiento	Uso y dilución
M488	Generado en burro, reconoce anticuerpos primarios de ratón	IF: 1/500. Emite en verde. Absorbe a 495 y emite a 519nm
GAM-HRP	Generado en cabra, reconoce anticuerpos primarios de ratón	WB: 1/50.000
GAR-HRP	Generado en cabra, reconoce anticuerpos primarios de conejo	WB: 1/50.000
GAH-HRP	Generado en cabra, reconoce anticuerpos primarios humanos	WB: 1/5.000
DAG-HRP	Generado en burro, reconoce anticuerpos primarios de cabra	WB: 1/25.000

Tabla MyM 2. Anticuerpos secundarios utilizados en este estudio.

sacrificados, y el suero extraído como se ha descrito anteriormente.

Para llevar a cabo la purificación de los sueros 464, 467 y 468, proceso

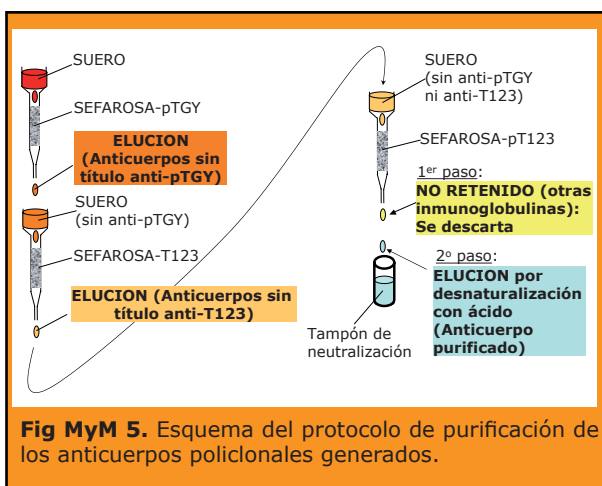
nida fue congelada a -20°C en partes alícuotas.

Inmunizamos 8 conejos, los nº 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468 y 469, con esta mezcla. De manera previa a la primera inmunización, extrajimos suero preinmune de estos animales. Para ello se incubó la sangre durante 4 horas a temperatura ambiente y 16h a 4°C , se retiró el coágulo formado, se centrifugó durante 20 minutos a $2700\times g$ a 4°C y se recogió el sobrenadante.

Antes de la primera inoculación a los conejos, se preparó una emulsión de 1,2ml Adyuvante Completo de Freund (CFA) con

que se esquema-tiza en la **figura MyM 5**, en primer lugar se acoplaron a resinas Affigel10/15 de BioRad el péptido P-TGY (RHTDDEmpTGpYVATRWYR), el péptido no fosforilado T123 (QKLTDDH VQFLIYC) y el fosfo-péptido P-T123 (QKLpTDD HVQFLIYC). Los péptidos fueron generados por GenScript.

Para el acoplamiento, se disolvieron 10mg de cada péptido en 4ml de HEPES 100mM pH 7 5% DMSO. Se tomaron 4ml de Affigel10 para el péptido P-TGY (pI 7,7), y 4ml de Affigel 15 para los péptidos T123 y P-T123 (pI menores), y se lavaron con 10 volúmenes de agua destilada a 4°C . Se mezclaron entonces los péptidos y las resinas y se mantuvieron en agitación durante 24 horas a 4°C , tras lo que las mezclas fueron centrifugadas y los sobrenadantes eliminados. Para el bloqueo de los de ésteres reactivos, las resinas de trataron con etanolamina 100mM pH 8 durante 3 horas a 4°C , se lavaron con dos volúmenes de tampón Tris 10mM pH 7, y se guardaron protegidas de la luz a 4°C .



1,2ml del antígeno (2mg/ml). Esta mezcla se inyectó a los conejos, 250µl por animal (250µg de fosfopéptido), en diferentes partes del cuerpo y cambiando la vía de inoculación (intramuscular/intradérmica/subcutánea).

Se realizaron cuatro inmunizaciones más, para las que se preparó la emulsión del antígeno con el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA), con un intervalo de dos semanas entre ellas. Seguidamente, los animales fueron

Una parte alícuota de cada suero seleccionado se inactivó durante 30 minutos a 56°C , y se diluyó 1:5 en PBS hasta un volumen final de 10ml. El resultante de pasó por una columna de Affigel acoplado al péptido P-TGY posteriormente por una columna de Affigel acoplado al péptido T123, con Tris 10mM pH 7.

A continuación se mezcló el Affigel acoplado al péptido PT123 con el eluido y se incubó en agitación 24 horas a 4°C . Seguidamente se lavó la columna con 30-50 volúmenes de Tris 10mM pH 7 y con 30-50

volúmenes de Tris 10mM pH7 500mM NaCl, para eliminar posibles uniones inespecíficas. Por último se lavó con 30-50 volúmenes de Tris 10mM pH 7.

Se llevó a cabo una elución ácida, con 10 volúmenes de Gly 0,1M pH 2,5 a un flujo muy lento. Se recogieron 10 fracciones para cada suero de 1ml en tubos con 100µl de Tris 1M, para neutralizar el pH ácido. Se analizaron las fracciones por ELISA, de manera similar a la descrita previamente, y aquéllas con mejor título fueron congeladas con azida sódica 0,025% y BSA libre de inmunoglobulinas a 0,01 mg/ml.

La concentración de proteínas es de 72,3mg/ml para el suero 462, 113,11mg/ml para el suero 463, 65,37mg/ml para el suero 464, 72,46mg/ml para el suero 465, 83,33mg/ml para el suero 466, 86,8mg/ml para el suero 467, 60,33mg/ml para el suero 468, 61,43mg/ml para el suero 469. La concentración de proteínas para los sueros purificados es de 0,05mg/ml.

7.3. Fosfoanticuerpos recombinantes producidos por AbD Serotec

Estos anticuerpos, denominados R1 (AbD16), R2 (AbD17), R3 (AbD18) y R4 (AbD19), están formados por la región Fab del anticuerpo humano, constituida por el dominio variable y la primera región constante de la cadena pesada y la cadena ligera –con su región variable y constante– (**figura MyM 6a**).

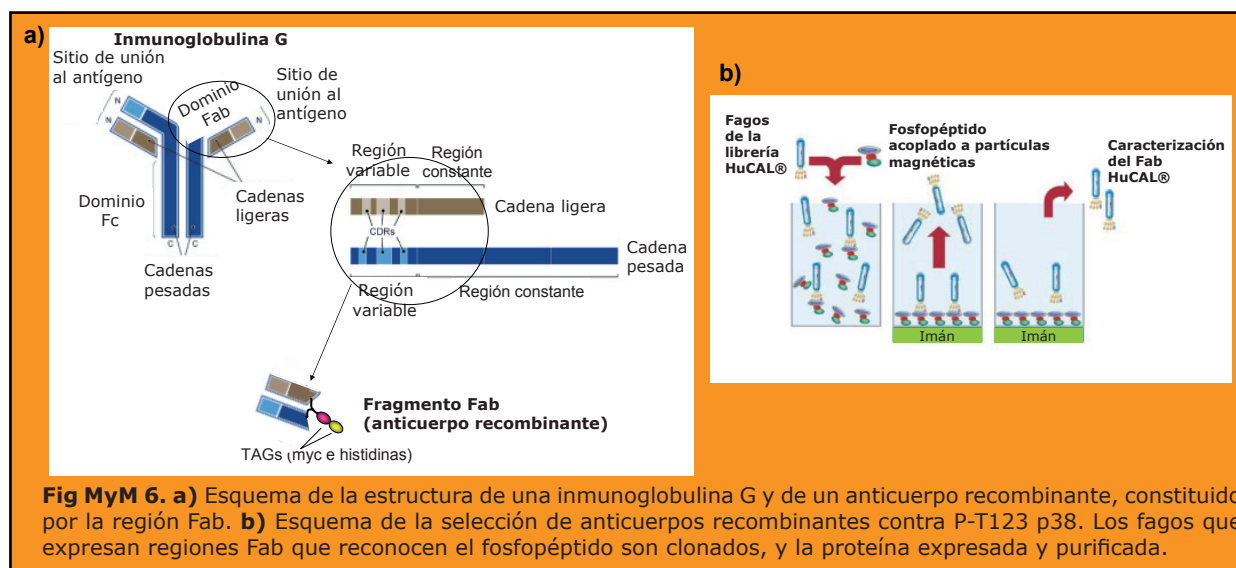
Fueron generados empleando la librería

HuCAL®.

La técnica se basa en la diversidad estructural de los anticuerpos humanos, que viene dada por 7 genes de la región variable de la cadena ligera y 7 de la pesada que dan lugar a 49 combinaciones distintas como estructura basal. Además, en cada región variable hay tres regiones hipervariables o CDRs, de 5-30 aminoácidos, que determinan la complementariedad del anticuerpo. La librería intenta copiar el repertorio de anticuerpos humanos, superponiendo en las 49 estructuras basales distintos CDRs generados utilizando trinucleótidos. El resultado son billones de anticuerpos, que se seleccionan mediante exposición ("display") empleando fagos.

Estos fagos recombinantes se producen en bacterias, y muestran las partículas Fab en su cubierta. De manera que se pueden seleccionar los fagos que se unen al antígeno deseado (**figura MyM 6b**), se aíslan los genes y se insertan en un vector de expresión para *E. coli*.

Para el desarrollo de nuestros fosfoanticuerpos, en primer lugar se diseñó y sintetizó un péptido antigénico (QKL-T-DDHVQFC), así como dos péptidos para la selección negativa (péptido no fosforilado y fosfopéptido-TGY: DEM-pT-G-pY-VATRC). Estos péptidos fueron acoplados a dos transportadores diferentes: BSA y transferrina humana. A continuación se realizó el cribado y selección de los clones de la librería HuCAL® positivos para el antígeno y negativos para los péptidos de selección negativa.



Se secuenciaron 20 clones, y de ellos se seleccionaron los cuatro mejores, que fueron micropurificados por cromatografía de afinidad.

Estos anticuerpos están acoplados a myc y a una cola de histidinas.

Su concentración de proteínas es de 1,33mg/ml para R1, 1,71mg/ml para R2, 2,13mg/ml para R3 y 1,49mg/ml para R4.

7.4. Fosfoanticuerpos monoclonales producidos por Biogenes

Se sintetizaron dos péptidos de 12 aminoácidos: CKCQ-KLpTDDHVQ-amida y CKCQ-KLTDDHVQ-amida y se acoplaron a TFA.

A continuación, se inmunizaron 10 ratones con el fosfo-anticuerpo y se extrajeron linfocitos B del bazo, que fueron fusionados con células tumorales de mieloma múltiple (ver **figura MyM 4**). Estas células tumorales son deficientes en enzimas implicados en la síntesis del nuevo ADN como la timidina quinasa (TK) o la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Los productos de la fusión celular (hibridomas) son cultivados en medio HAT (de hipoxantina, aminopterina y timidina) donde las células que no son hibridomas son eliminadas.

Por último, se realizaron dos clonajes consecutivos para desarrollar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales específicos contra el fosfopéptido. Los anticuerpos monoclonales producidos son M1 (Biogenes 1-4-21), M2 (Biogenes 2-2-9) y M3 (Biogenes 12-1-1).

La concentración de proteínas de los anticuerpos tras el segundo clonaje es de 3,09mg/ml para el anticuerpo M1, 4,41mg/ml para M2 y 4,66mg/ml para M3.

8. INMUNOPROTOCOLOS

8.1 Inmunodetección tras electroforesis (western-blot)

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfieren a un filtro de nitrocelulosa (Transblot de Bio-Rad) mediante transferencia líquida en tampón carbonato pH 10 durante 100 minutos a 350mA/ cubeta.

Tras teñir la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau, se incubaba como mínimo una hora con TBS (Tris-HCl 10mM pH 7.5, NaCl 150mM), Tween20 al 0,2% y leche en polvo al 5% p/v para bloquear posibles sitios de unión inespecífica. Tras descartar el medio de bloqueo, se incubaba la membrana con una dilución del anticuerpo en TBS con Tween20 al 0.2%, azida sódica 0,02% y BSA 1-5%. Antes de incubar con el anticuerpo secundario, se lava la membrana 3x10 minutos con TBS-Tween20 al 0.2%. Para el revelado se emplea un método quimioluminiscente en el que la peroxidasa cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de H₂O₂ (ECL, Amersham). La cuantificación se realiza utilizando el densitómetro de Bio-Rad GS-710 Calibrated Imaging Densitometer con el software Quantity One.

Para intentar preservar los epítomos fosforilados, en determinados experimentos se realizó el bloqueo con TBS-Tween20 con Phospho-Blocker de Cell Biolabs al 5%.

Cuando se reutilizan las membranas, se realiza un tratamiento con 2-β-mercaptoetanol 10mM, 2%SDS y Tris HCl pH 6.7 62.5mM durante 30 minutos a 65°C, o bien con Gly 100mM pH 2.5 durante 10 minutos a temperatura ambiente, para eliminar los anticuerpos unidos a la membrana de nitrocelulosa. A continuación se realiza de nuevo el bloqueo y la incubación con el siguiente anticuerpo primario.

8.2. Inmunoprecipitación

Para realizar la inmunoprecipitación, se reserva una parte del lisado, que se mezcla con tampón de ruptura y se hierve durante 5 minutos. A continuación se añade el anticuerpo al resto del lisado y se incubaba 2-12h a 4°C en agitación. Como control de inmunoprecipitación se emplea suero preinmune para los anticuerpos primarios policlonales y un anticuerpo monoclonal no relacionado para los monoclonales. Si el anticuerpo primario utilizado no está acoplado a agarosa, se añaden 30μl de proteína A-agarosa al 50% (cuando el primario es policlonal) o 20μl de proteína G-agarosa (cuando es monoclonal) y se incubaba al menos 1h más. Los complejos se lavan 3 veces centrifugando a 1100rpm durante 5 minutos en tubos Falcon de 15ml con 10ml de tampón de inmunoprecipitación frío (similar al tampón de lisis en composición,

sólo que los únicos inhibidores de proteasas y fosfatasa que contiene son PMSF y NaF). Las proteínas inmunoprecipitadas con la agarosa se resuspenden en tampón de ruptura de electroforesis y se hierven durante 5 minutos. Las muestras se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y a inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente.

Los experimentos de coimmunoprecipitación de GRK5 con Gα_{12/13} fueron realizados en presencia de suero.

8.3. Ensayo de sedimentación (pull down)

Para el ensayo de sedimentación (pull down) con una resina de afinidad con níquel (Probond, GS-Healthcare), se utilizaron GST-MEK-His purificada (Upstate, 100nM,) y GRK2 recombinante purificada en el laboratorio (25nM, 80 kDa) o GST como control negativo en 15μl de tampón Hepes 20mM pH 7,4, MgCl₂ 5mM y NaCl 150mM 30 minutos en hielo. Tras incubar 1h en hielo con 15μl de resina al 50%, se precipitaron los complejos por centrifugación y se realizaron 3 lavados con 1,5 ml de tampón de interacción. La cantidad de GRK2 precipitada en cada condición se reveló con anti-GST/GRK2 (PF2), que también revelaba la proteína GST-MEK-His en el sedimento.

8.4. Inmunofluorescencia

Para realizar una inmunofluorescencia se siembran las células en cristales de 12mm de diámetro de Thermo-scientific previamente recubiertos con poli-lisina 10μg/ml en p24.

Tras la fijación en paraformaldehído al 3,9%, los cristales con células se incuban en PBS TritónX100 0,1% durante 10 minutos para permeabilizar las células. Posteriormente se bloquean durante 30 minutos en PBS TritónX100 0,1% y BSA 1% para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario.

A continuación se incubaba durante 1 hora con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo y se realizan 3 lavados con PBS. Después se incubaba 45 minutos en oscuridad con el anticuerpo secundario diluido también en solución de bloqueo, y se realizan 3 lavados en PBS. Por último, se sumerge el cristal en agua y se monta con

medio de montaje MOWIOL-DABCO. Se deja secar en oscuridad toda la noche y se analiza mediante microscopía de fluorescencia, con un microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss) acoplado a una cámara ccd color.

Cuando se realiza en el mismo cristal la tinción con *oil red* y la inmunofluorescencia, se incubaba primero durante 1 hora con *oil red* 60:40 (v/v) en agua (*oil red* disuelto en isopropanol 1% p/v) y después se realiza la inmunofluorescencia.

8.5. ELISA sobre péptidos

Se sembraron por duplicado en una placa de 96 pocillos 0,5μg de un péptido no relacionado del mismo tamaño, 0,5μg de BSA, 0,5μg del fosfopéptido P-T123 acoplado a BSA, 0,5μg del péptido no fosforilado en T123, 0,5μg del fosfopéptido P-T123, 0,5μg del péptido no fosforilado en T123 y 0,5μg del fosfopéptido P-TGY en un volumen final de 125μl de PBS. Se incubó la placa durante 16 horas a 37°C, tras lo que se realizó un bloqueo con 150μl de PBS 3% BSA durante una hora a 37°C. Se incubaron los pocillos con los fosfoanticuerpos diluidos en PBS Tween 0.05% BSA 1% durante 1 hora a 37°C, tras lo que se realizaron 3 lavados con PBS Tween 0.05%. El ELISA se reveló con 50μl/pocillo de GAR-HRP 1:1000 (para los primarios policlonales), GAH 1:5000 (para los recombinantes generados por AbDSerotec) o GAM 1:1000 (para los primarios monoclonales generados en Biogenes) en PBS Tween 0,05% BSA1% durante una hora. Tras 3 lavados, se reveló el ELISA con 150μl de solución ortofenil-diamina (OPD) (4ml de tampón fosfato 100mM pH 6, 4μl de H₂O₂ y 4mg de OPD) en oscuridad durante 15-20 minutos. Por último se determinó la absorbancia a 450nm.

9. FOSFORILACIÓN IN VITRO

9.1. Fosforilación de p38 por GRK2

En un volumen final de 40μl de reacción se mezclan 100nM de GST-p38 recombinante de Invitrogen con 100 o 200nM de GRK2 recombinante generada en el laboratorio, 10μl de tampón 4x (Hepes 100mM, AcMg

40mM, NaF 18mM, ATP 0,2mM) y agua.

En los puntos radiactivos se añaden 3µl de ATP marcado radiactivamente (10µCi/µl), por cada 40µl de tampón de fosforilación. La reacción se lleva a cabo a 30°C durante 1 hora. Después se añade tampón de ruptura 4x, se hierven las muestras durante 5 minutos y se resuelven en geles del 8% PAGE. Los geles secos se exponen en películas a -70°C durante el tiempo necesario para visualizar las bandas por autorradiografía.

9.2. Fosforilación de p38 por MKK6

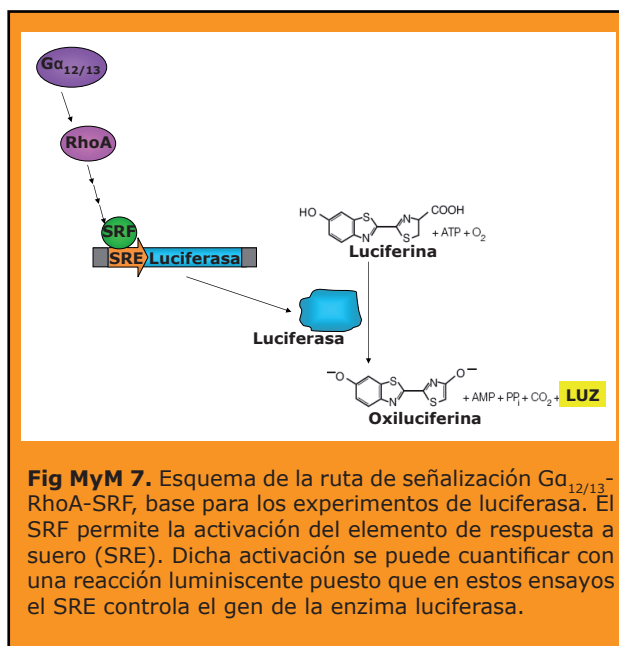
En un volumen final de 40µl de reacción se mezclan 100nM de GST-p38 recombinante de Invitrogen con 5nM de MKK6 (activa) de Upstate, 8µl de tampón de activación 5x (TrisHCl 500mM, EGTA 1mM, Ortovanadato 1mM, β-mercaptoetanol 1%), 10µl de tampón Mg/ATP (Hepes 2,5mM, MgAc 50mM, ATP 500µM) y agua. En los puntos radiactivos se añade ATP marcado radiactivamente (33.000 cpm/pmol de ATP). La reacción se lleva a cabo a 30°C durante 1 hora. Después se añade tampón de ruptura 4x, se hierven las muestras durante 5 minutos y se resuelven en geles del 8% PAGE.

9.3. Fosforilación de ERK por MEK1

En un volumen final de 25µl de reacción, se mezclan 0,25 µg de ERK inactiva recombinante de SinalChem, 5µl de tampón de ensayo 5x (25nM β-glicerofosfato, 20mM Tris HCl pH 7,5, EGTA 5mM, Ortovanadato sódico 1mM, DTT 1mM) pH 7,5, MEK1-GST recombinante de Calbiochem, BSA o GRK2, 5µl de tampón Mg/ATP 5x (75mM MgCl₂, 500µM ATP), y se completa con tampón de dilución de ERK (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8, 2mM DTT). La reacción se lleva a cabo a 30°C durante 3 horas. Después se añade tampón de ruptura 4x, se hierven las muestras durante 5 minutos y se resuelven en geles del 8% PAGE.

10. ENSAYOS LUCIFERASA (ACTIVACIÓN DEL ELEMENTO DE RESPUESTA A SUERO -SRE-)

Estos ensayos cuantifican la activación de la ruta Gq_{12/13}-RhoA-SRF (ver **figura MyM 7**). La activación del SRE se analizó por co-transfección de células Cos7 en placas p12 con los plásmidos de expresión indicados

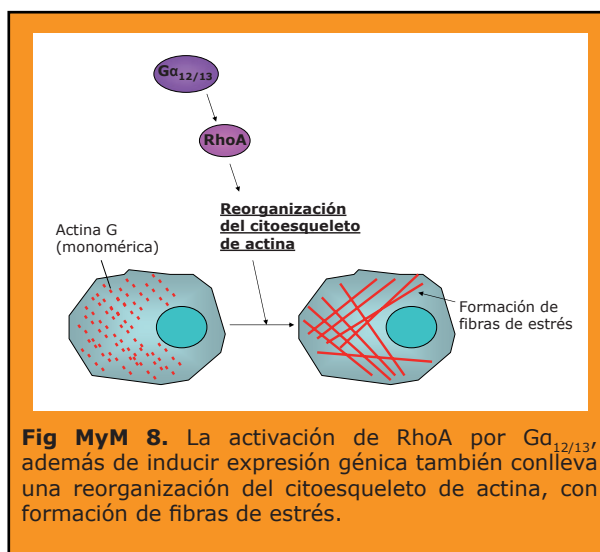


junto con el vector con el gen luciferasa bajo el control de elementos SRE (SRE-LUC) y un plásmido control de la eficiencia de transfección (pCDNA3-βGalactosidasa). 24 horas después, se añadió 100µl de tampón de lisis reportero del kit para Luciferasa de Promega "Luciferase Assay System", y las placas fueron congeladas a -20°C. Posteriormente, se midió la actividad luciferasa expresada de las muestras con 20µl del lisado en tubos Rohren empleando el luminómetro Monolight 2010 (Analytical Luminiscense Laboratory San Diego, CA). La medida de actividad βGalactosidasa para la normalización se realiza mediante una reacción colorimétrica, mezclando 25 µl de cada lisado con 25 µl de reactivo β-galactosidasa 2 x (Na₂HPO₄ 120mM, NaH₂PO₄ 80mM, MgCl₂ 2mM, β-mercaptoetanol 100mM, orto-Nitrofenil-β-galactosido -ONPG- 1,33mg/ml), parando la reacción con carbonato sódico 1,2M, y midiendo

la absorbancia a la longitud de onda de 405nm.

11. ENSAYOS DE FORMACIÓN DE FIBRAS DE ESTRÉS

Estos ensayos constituyen otra manera de valorar la activación de la ruta $G\alpha_{12/13}$ -RhoA-SRF (ver **figura MyM 8**). Se sembraron



10.000 células Cos7 por pocillo de placas p24, en los que se habían colocado cubre objetos circulares de 10mm de diámetro de Menzel-Glaser y que habían sido recubiertos con fibronectina. Las células fueron transfectadas con vectores de expresión para hGFP o para myc-GRK5-K215R. 24 horas después de la transfección, las células se sometieron a un ayuno de 16 horas, tras lo cual fueron estimuladas con LPA $10\mu\text{M}$ durante 7 horas. A continuación fueron sometidas a fijación con PFA 4% durante 20 minutos, y se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia, empleando Faloidina-TRITC de Sigma (P-1951) que emite en rojo para teñir las fibras de estrés, y una tinción anti-myc con un anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo que emite en verde para identificar las células transfectadas con myc-GRK5-K215R.

12. ENSAYOS EN ANIMALES

Los ratones que se han utilizado en los experimentos son de la cepa C57Bl6, de

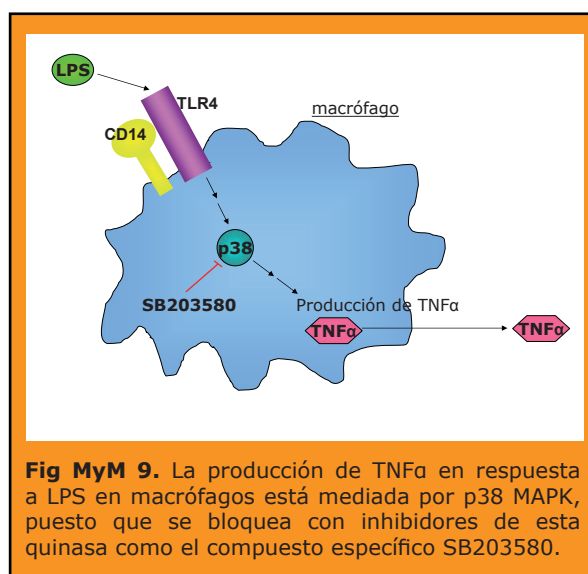
genotipo GRK2+/+ (silvestres) o GRK2+/-, puesto que los homocigotos GRK2-/- mueren en estadio embrionario. Fueron cedidos por el Dr. Marc G. Caron (Duke University Medical Center, North Carolina).

12.1. Obtención y procesamiento de macrófagos peritoneales murinos

La producción de TNF α en respuesta a LPS en macrófagos está mediada por p38 MAPK, como se esquematiza en la **figura MyM 9**.

Para realizar el análisis de la producción de TNF α en respuesta a LPS, los ratones GRK2+/- o silvestres fueron sometidos a inyección intraperitoneal de 1ml de tioglicolato (Sigma). 4 días más tarde se sacrificaron los animales con CO $_2$ y se realizó un lavado de la cavidad intraperitoneal con 15ml de PBS frío y estéril. Se lisaron los eritrocitos presentes con un tampón que contiene CINH $_4$, CO $_3$ HK y EDTA. Se detuvo el proceso con RPMI 0,5% FCS, se centrifugó y se resuspendió en el mismo medio. Se cuantificó el número de macrófagos y se plaquearon eliminando mediante lavados extensivos las células no adheridas tras 2 horas sobre plástico.

Para los ensayos de ELISA se sembraron 10^6 macrófagos por pocillo de placa p12. Tras 2 horas de incubación se realizaron 5 lavados con PBS para eliminar los linfocitos, que no se habían adherido a la placa. Se añadió 1ml de RPMI 0,5% FCS. En los pocillos control se añadió SB203580 (Calbiochem)



30 μ M durante 30 minutos. A continuación se incubó con LPS (Sigma) 0,5, 0,25 y 0,15 μ g/ml durante 16 horas. Se analizó el sobrenadante con el kit de ELISA "Tumor Necrosis Factor Alpha Mouse, Biotrak ELISA System" de GE-Healthcare (anteriormente Amersham Biosciences).

El tampón de lisis e inmunoprecipitación empleado con los macrófagos primarios de ratón está compuesto por Tritón X100 1%, Glicerol 10%, NaCl 137mM, Tris pH 7.5 20mM, EDTA 0.5mM, NaF 10mM, PMSF 1mM. Para la lisis se añade una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa: Na₃Vo₄ 200 μ M, benzamidina 1mM, aprotinina 10 μ g/ml, β Glicerofosfato 25mM y pirofosfato sódico 5mM. Tras añadir el tampón a las células se incubaba en hielo 20 minutos. El lisado es clarificado por centrifugación durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C.

12.2. Obtención y procesamiento de tejidos

La extracción de corazones se llevó a cabo anestesiando a los animales con isoflurano por inhalación, accediendo a la cavidad torácica e inyectando de manera intracardiaca KCl frío para detener el corazón en diástole por sobrecarga de potasio. A continuación los corazones se pesaron y se

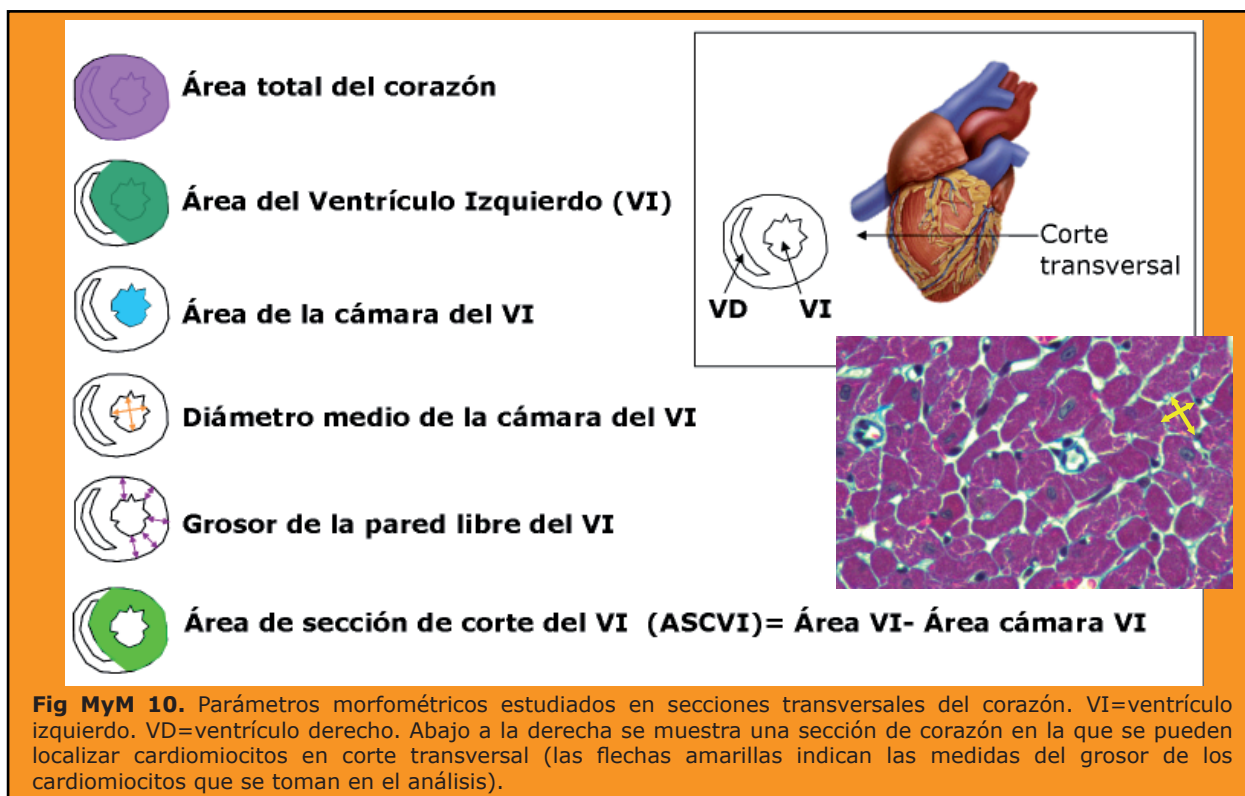
seccionaron, dividiéndolos en tres partes: la apical fue congelada a -70°C para el análisis de proteínas, la media se incubó en formalina durante 24 horas para el análisis histológico y morfométrico, y la parte superior fue incubada en RNA later, de Qiagen, durante 16 horas a 4°C y posteriormente a -70°C para el análisis del RNA.

Para el análisis de proteínas, las porciones de tejido fueron pulverizadas en nitrógeno líquido y se realizó la lisis en un tampón de lisis hipotónico compuesto por Tris HCl pH 7.5 20mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, PMSF 1mM, Aprotinina, Benzamidina, y PhoSTOP (de Roche). A continuación las muestras fueron incubadas durante una hora en agitación a 4°C, y clarificadas por centrifugación durante 15 minutos a 4°C.

Para la extracción de plasma, se extrajo sangre heparinizada, que se sometió a centrifugación a 2000g durante 20 minutos a 4°C, y se conservó a -70°C.

12.3. Estudio de los parámetros morfométricos del corazón

Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el grupo de Maria Antonia Fortuño del C.I.M.A (Universidad de Navarra). Tras la fijación en formalina de los corazones, fueron embebidos en parafina y



seccionados transversalmente en la región medial con microtomo. Se realizaron las tinciones de Tricrómico de Masson (empleada en el análisis morfométrico y en el análisis del grosor de los cardiomiocitos) y de Rojo Sirio (empleada para la detección de fibrosis).

Se realizó un escáner de las tinciones de Tricrómico de Masson junto con un calibrador de 1mm con divisiones de 0,01 mm, y se analizaron los parámetros que se esquematizan en la **figura MyM 10**. Además, se calcularon los cocientes ASCVI/área de la cámara del VI y GPVI/diámetro de la cámara del VI.

Las medidas fueron realizadas empleando el software AnalySIS®, de Soft Imaging System.

12.4. Análisis del grosor de los cardiomiocitos

El grosor de los cardiomiocitos se analizó localizando en los cortes de corazón, teñidos con Tricrómico de Masson y analizados en microscopía óptica con objetivo 40x, regiones en las que estas células han sido cortadas de manera transversal, como se muestra en la **figura MyM 10**.

Las medidas fueron realizadas empleando el software AnalySIS®, de Soft Imaging System.

12.5. Cuantificación de la fibrosis en cortes de corazón

Las medidas de fibrosis se realizaron capturando imágenes de alta resolución con un Microscopio Automatizado Zeiss AXIO Imagen, empleando el software Axiovision. El análisis se realizó con el AnalySIS®, de Soft Imaging System.

12.6. Efecto de la edad

Ratones macho fueron seleccionados y se mantuvieron en el animalario hasta los 4 ó 9 meses de edad (en algunos casos hasta 15 meses), momento en el que fueron sacrificados.

12.7. Tratamiento de los ratones con insulina

Estos experimentos se realizaron en colaboración con el grupo de la Dra. Margarita

Lorenzo (Universidad Complutense de Madrid). Se inyectó insulina intraperitoneal de manera aguda a ratones de 10 semanas de edad, que fueron sacrificados 15 minutos después de la inyección.

12.8. Estudio ecocardiográfico

El estudio ecocardiográfico se realizó en el animalario del CNIC, en colaboración con el Dr. Jiménez Borreguero y con el apoyo técnico de Juan José Lazcano y de Fernando García. Se analizaron 4-5 ratones de 9 y de 15 meses de edad.

12.9. Estudio de la presión arterial

Este estudio fue llevado a cabo en colaboración con Marisol Avendaño, del grupo de Mercedes Salaíces, en la Facultad de Medicina de la U.A.M. por mediciones de la presión arterial en la cola mediante *tail-cuff* tras acostumbramiento de los ratones a la encapsulación durante varios días.

12.10. Test de tolerancia a glucosa e insulina

Las pruebas de tolerancia a glucosa (GTT) y a insulina (ITT) se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de Margarita Lorenzo (U.C.M.).

Para las GTTs, los animales silvestres o GRK2+/- de 9 meses de edad fueron sometidos a ayuno durante al menos 6 horas, tras lo que se administró un bolo de glucosa intraperitoneal y se midió la glucosa en sangre en el tiempo extrayendo sangre de la cola del ratón y empleando un analizador automático (Accucheck, de Roche). También se extrajo sangre a diferentes tiempos para analizar mediante ELISA (Linco Research, St. Louis, MO) la concentración de insulina.

Para las ITTs, los animales se sometieron de igual manera a ayuno, tras lo que se suministró insulina intraperitoneal y se determinó la concentración de glucosa en sangre en el tiempo, empleando el mismo método.

13. TRATAMIENTO MATEMÁTICO Y ESTADÍSTICO

Las figuras presentadas muestran las medias aritméticas de los experimentos, con el error estándar de la media como barras de error.

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando las herramientas Excel y SPSS 17.0. Se realizaron pruebas T de Student para comparar dos poblaciones entre sí, tanto trabajando con grupos de animales como en los diferentes experimentos a nivel bioquímico tal y como se especifica en cada figura. También se llevaron a cabo análisis de ANOVA para analizar procesos más complejos, como el envejecimiento en animales silvestres o GRK2+/- tal y como se especifica en cada caso.

14. JUSTIFICACION DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS

14.1. Interacciones funcionales entre GRKs y MAPKs

14.1.1. Regulación de $G\alpha_{12}$ por GRK5 de manera dependiente de ERK

Empleamos como abordaje experimental por un lado cultivos celulares de células epiteliales de riñón embrionario humano (HEK293) debido a que es un modelo experimental ampliamente utilizado, en el que se habían realizado los resultados preliminares y a que su eficiencia de transfección es muy alta. Para determinar qué efecto tiene la modulación de GRK5 por MAPK en procesos celulares mediados por $G\alpha_{12}$, hemos elegido la activación del Elemento de Respuesta a Suero (SRE) y ensayos de formación de fibras de estrés en presencia de LPA en células Cos7. A pesar de que estos procesos están mejor caracterizados en células NIH3T3 (Buhl et al. 1995), se ha descrito que en estas células la formación de fibras de estrés en presencia de LPA depende de $G\alpha_{13}$ y no de $G\alpha_{12}$ (Gohla et al. 1998). En la línea celular Cos7, las fibras de estrés son fácilmente visualizables tras tinción con Faloidina al sembrarse sobre sustratos de adhesión (Shibasaki et al. 1997)

y además es un modelo bien establecido para el estudio de las funciones celulares de $G\alpha_{12}$ (Suzuki et al. 2009).

14.1.2. Regulación de p38 por GRK2

14.1.2.1. Macrófagos peritoneales

Dado que los niveles de GRK2 están disminuidos en procesos inflamatorios en los que se observa que p38 está activada, como es la artritis reumatoide en humanos o un modelo de artritis inducida por adyuvante en rata (Lombardi et al. 1999; Lombardi et al. 2001), quisimos comprobar si los menores niveles de GRK2 pueden influir en la mayor activación de p38 y, por tanto, en una mayor producción de citoquinas inflamatorias. Para ello hemos elegido como sistema modelo la producción de $TNF\alpha$ en respuesta a LPS (lipopolisacárido bacteriano) en macrófagos peritoneales de ratón, ya que tienen la ventaja de ser células primarias cuyas rutas de señalización no estarán alteradas por la inmortalización o los sucesivos pases en cultivo. Además, en ellas esta respuesta inflamatoria es estrictamente dependiente de p38 (Grissold et al. 1996), y son un sistema ampliamente utilizado para la caracterización de inhibidores de p38 y el estudio de su ruta (van den Blink et al. 2001) (Fujisawa et al. 2005). También hemos escogido estos macrófagos por su importancia fisiopatológica, ya que constituyen la primera barrera de defensa en la cavidad peritoneal y son los responsables de reclutar a otras células inmunes a la zona.

14.1.2.2. Diferenciación de células preadipocíticas 3T3L1 a adipocitos

Elegimos este sistema experimental para caracterizar cómo afecta GRK2 a procesos celulares mediados por p38 en base a que el proceso de diferenciación en cultivo de esta línea celular en presencia de insulina y otros factores es estrictamente dependiente de p38 y, además, está ampliamente caracterizado en la literatura (Engelman et al. 1999).

14.1.2.3. Otros tipos celulares

Hemos realizado un cribado analizando distintos tipos celulares sometidos a estímulos adecuados a los receptores que expresan y a los fenómenos titulares en los que están involucrados en cada caso. Hemos intentado explorar un abanico amplio de tipos celulares de muy variado origen para realizar un estudio lo más amplio posible: diversos tejidos humanos y murinos,

líneas celulares de diferente etiología (hematopoyética, muscular, epiteliales, etc), y muestras de biopsias humanas tumorales y no tumorales.

Además, hemos generado una batería de fosfo-anticuerpos dirigidos contra el epítipo de p38 fosforilado por GRK2 con el objetivo de mejorar la detección de esta fosforilación, y los hemos testado utilizando proteínas *in vitro* así como empleando muestras generadas a partir de células o tejidos.

14.1.3. Regulación de ERK por GRK2

Como modelo experimental hemos empleado, para el estudio molecular, células HEK293 por su alta eficiencia de transfección y a que es un modelo experimental utilizado ampliamente. Además, se han llevado a cabo ensayos *in vitro* de sedimentación y fosforilación con proteínas purificadas, para analizar a nivel molecular esta regulación, eliminando los fenómenos que tienen lugar a nivel celular y pueden distorsionar la interacción. Por último, hemos utilizado esplenocitos y astrocitos derivados de ratones GRK2 +/- para ahondar en el posible papel de GRK2 en la regulación de fenómenos inflamatorios, dada la implicación de estos tipos celulares en estos fenómenos.

14.2. Efecto de la disminución en los niveles/actividad de GRK2 en la función cardíaca

Puesto que se ha descrito un incremento de los niveles de GRK2 durante patologías cardíacas (Gros et al. 1997), hemos estudiado el efecto de la disminución de los niveles o

actividad de GRK2 en la función cardíaca. Para ello, dado que no existen hasta la fecha inhibidores farmacológicos específicos para esta quinasa, hemos seleccionado un modelo animal de heterocigosis para el gen de GRK2, en el que los ratones heterocigotos (GRK2+/-) presentan una reducción del 50% en los niveles de esta GRK.

Éste es un modelo de inhibición de GRK2 a nivel sistémico que, frente a otros modelos en los que la depleción de GRK2 tiene lugar específicamente en tejido cardíaco, puede ser útil para trasladar los resultados obtenidos a la población humana, ya que la reducción sistémica pero parcial en los niveles de GRK2 puede compararse con los esperables tras una posible inhibición farmacológica.

Hemos elegido el proceso de envejecimiento en estos ratones, frente a estimulación aguda o crónica con distintas sustancias, por ser un proceso fisiológico comparable con un tipo de inhibición a largo plazo. Además, al contrario que los modelos inducibles (CreLox), la inhibición de GRK2 (en los ratones heterocigotos en comparación con los animales de fenotipo silvestre) comienza en los primeros estadios del desarrollo, y dan cuenta de los efectos globales de esta inhibición.

Hemos analizado dos procesos fundamentales que ocurren en el corazón en la patología cardíaca: fibrosis, e hipertrofia, tanto a nivel histológico como bioquímico. Hemos comparado estos animales con sus hermanos de camada homocigotos para GRK2 a los 4 y a los 9 meses de edad, analizando posibles diferencias en morfometría del corazón, ecocardiografía, presión arterial, señalización celular y expresión génica.

Resultados

Las Quinasas de Receptores acoplados a proteínas G (GRKs) fosforilan a los GPCRs activados promoviendo su desensibilización y reciclado, tal y como se describe en la introducción, pero son unas moléculas mucho más versátiles de lo que se estimó en un principio, siendo capaces de interactuar con otras proteínas y llevar a cabo otras funciones biológicas. A continuación se describen algunos avances en la investigación de estos papeles no clásicos de las GRKs.

1. INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE GRKs Y MAPK

Como se ha descrito, las GRKs pueden fosforilar otros sustratos distintos de GPCR, y también modular determinadas funciones celulares de forma independiente de fosforilación, participando en la propagación de la señal celular mediante el reclutamiento de distintos componentes de varias vías de transducción a localizaciones subcelulares específicas (Jurado-Pueyo et al. 2008). En particular, parece que existen interacciones funcionales complejas entre GRKs, arrestinas y cascadas de MAPK (revisado en (Ribas et al. 2007)). Describimos a continuación los resultados obtenidos al analizar tres de estas interacciones funcionales: la regulación de $G_{\alpha_{12}}$ por GRK5 de manera dependiente de ERK, la regulación de p38 por GRK2 y la regulación de ERK por GRK2.

1.1. Regulación de $G_{\alpha_{12}}$ por GRK5 de manera dependiente de ERK

Las proteínas G heterotriméricas, como se ha mencionado, son proteínas transductoras de la señal que están sometidas a estrictos sistemas de regulación (revisado en (Suzuki et al. 2009)). En la bibliografía, cada vez es mayor el número de proteínas reguladoras accesorias descritas para las proteínas G. Estas proteínas accesorias, distintas de GPCR y efectores clásicos, regulan la fuerza, eficacia y especificidad de la señal tras la activación del receptor o sitúan a las proteínas G en determinadas localizaciones, contribuyendo a la formación de complejos funcionales de transducción de la señal (Sato et al. 2006). Además, las proteínas G están implicadas de forma crítica en la regulación

de las MAPK (revisado en (Goldsmith et al. 2007)).

Se ha establecido previamente que GRK2 interactúa específicamente con la proteína G_{α_i} a través de su dominio de homología a proteínas RGS (RH) (Carman et al. 1999).

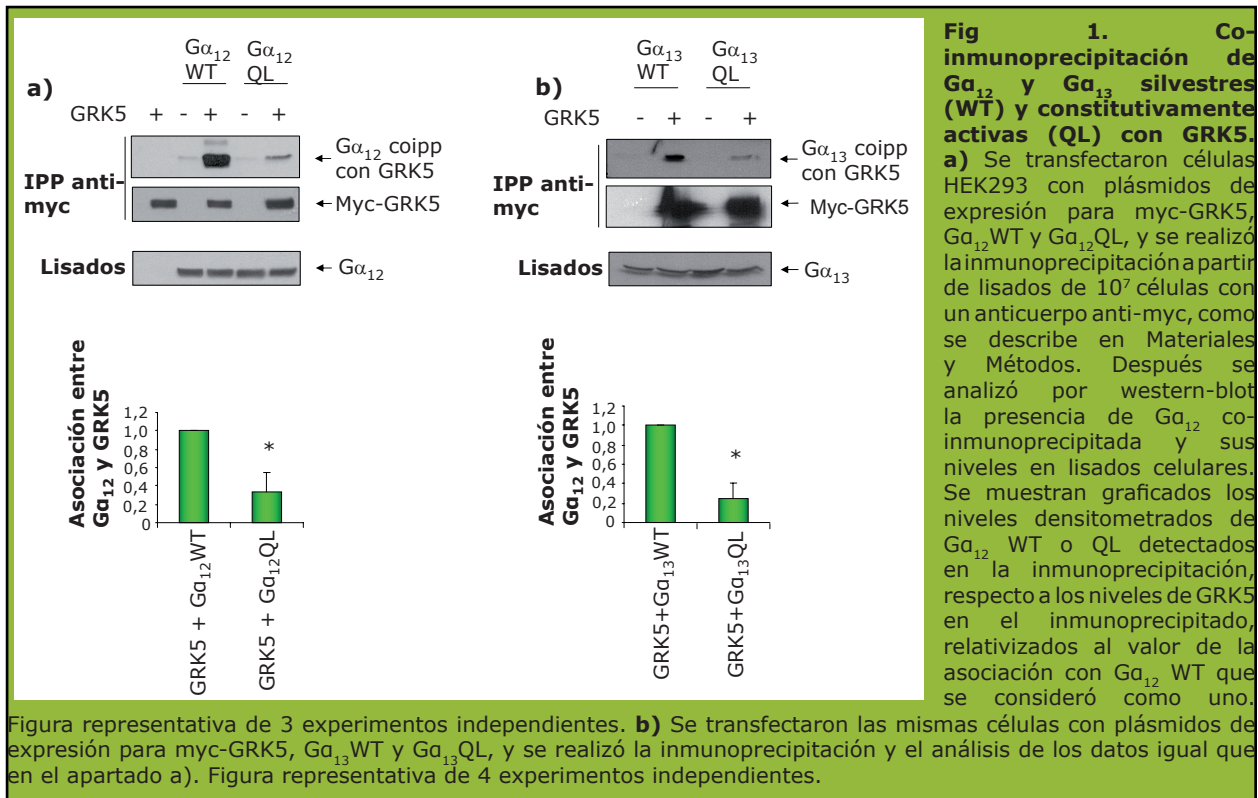
Resultados preliminares del laboratorio, descritos en la tesis doctoral de la Dra. Sandra Peregrín Pedrique (2005), sugerían que **GRK5 (que también presenta un dominio RH) interactúa con la subunidad $G_{\alpha_{12}}$ de las proteínas G heterotriméricas**. Por otra parte, la Dra. Peregrín también describió la fosforilación de GRK5 por ERK en el residuo S114, localizado en el dominio RH. La fosforilación en S114 no afectaba ni a la actividad, ni a la localización subcelular ni a la tasa de recambio de GRK5. La secuencia en el entorno de esta serina resulta muy similar a la de la proteína GAIP, cuya fosforilación en esta secuencia modula su interacción con proteínas $G_{\alpha_{13}}$ (Ogier-Denis et al. 2000).

En base a estos datos, nos planteamos caracterizar en más detalle si GRK5 está actuando como proteína accesorias de $G_{\alpha_{12}}$, y si este proceso es dependiente de ERK MAPK.

1.1.1. Influencia del estado de activación de $G_{\alpha_{12/13}}$ en su interacción con GRK5

En primer lugar, quisimos averiguar cómo afectaba el estado de activación de la proteína G a su interacción con GRK5. Empleamos como abordaje experimental cultivos celulares de células epiteliales de riñón embrionario humano (HEK293), cuya eficiencia de transfección es muy alta. En experimentos de co-inmunoprecipitación y, como se aprecia en la **figura 1a**, detectamos que la interacción de GRK5 con $G_{\alpha_{12}}$ WT es más estable que su interacción con el mutante constitutivamente activo $G_{\alpha_{12}}$ QL (que mimetizaría el estado estimulado de la proteína G), indicando que **la interacción de GRK5 con $G_{\alpha_{12}}$ depende del estado de activación de $G_{\alpha_{12}}$** .

Por otro lado, en la tesis doctoral de la Dra. Sandra Peregrín se mostraba que GRK5 no era capaz de interactuar con otras proteínas G, tales como G_{α_i} o G_{α_q} . Quisimos comprobar si esta especificidad se cumplía también con una proteína de la misma familia que $G_{\alpha_{12}}$, como es $G_{\alpha_{13}}$, que



sin embargo muestra algunas diferencias importantes tanto de secuencia como funcionales (revisado en (Suzuki et al. 2009)). Como se muestra en la **figura 1b**, **GRK5 es también capaz de interactuar con $G\alpha_{13}$, y esta interacción es asimismo dependiente del estado de activación de la proteína G**, siendo más débil con un mutante constitutivamente activo de $G\alpha_{13}$ (QL).

1.1.2. Influencia de la interacción entre GRK5 y $G\alpha_{12}$ en respuestas celulares mediadas por $G\alpha_{12}$

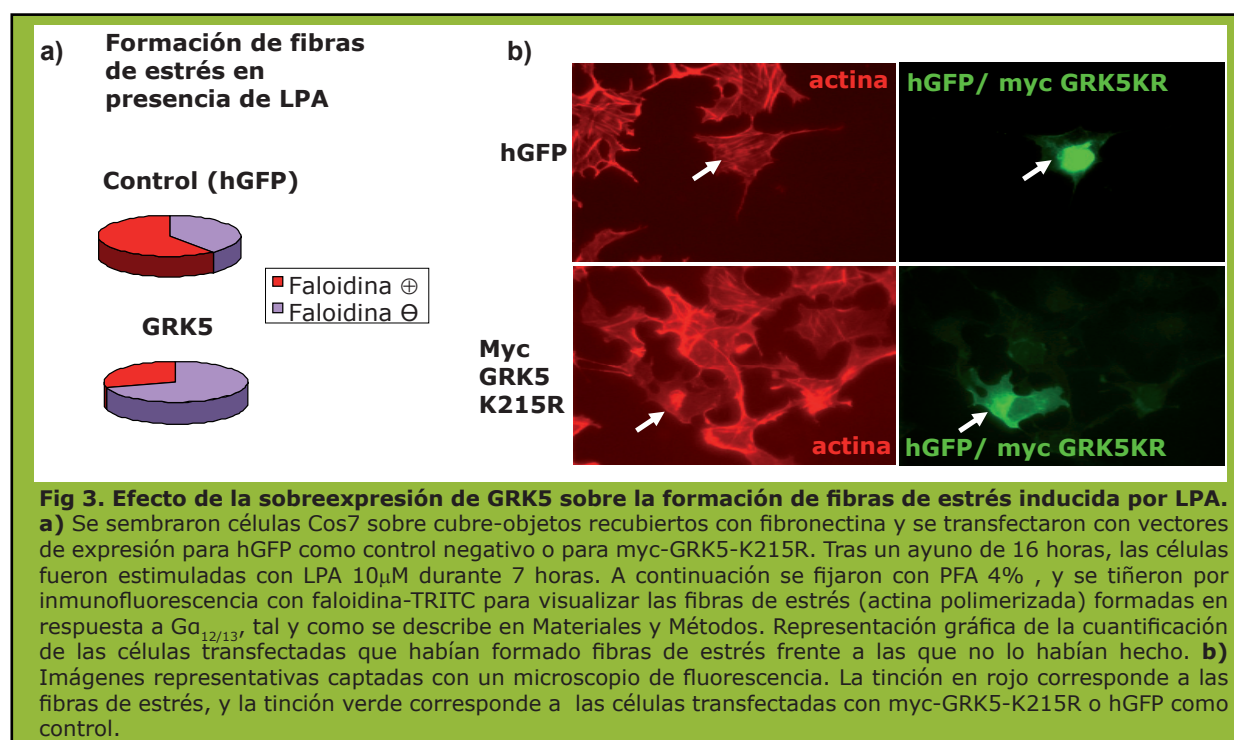
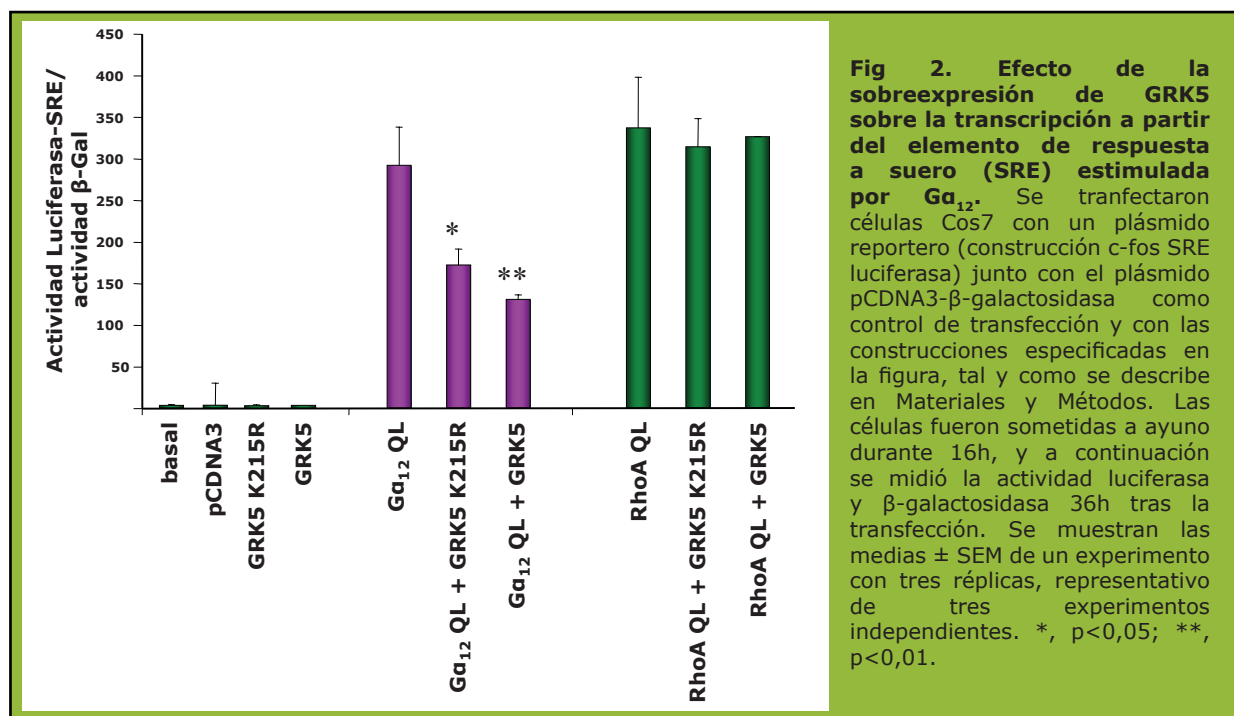
Quisimos investigar si la interacción entre GRK5 y proteínas de la familia $G\alpha_{12}$ puede afectar a las funciones celulares dependientes de estas proteínas G, con el fin de averiguar posibles implicaciones biológicas de esta modulación. Para ello, decidimos realizar dos tipos de ensayos celulares en los que la dependencia de estas proteínas G está bien establecida: experimentos de regulación de la transcripción regulada por el Elemento de Respuesta a Suero (SRE) (Gutkind 1998) y de formación de fibras de estrés por G_{12} QL (Hall 1998).

Llevamos a cabo ensayos de cuantificación de la transcripción a partir del elemento de respuesta a suero, transfectando una

construcción que contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de c-fos (que contiene un SRE canónico), junto con la expresión de G_{12} QL como inductor de dicha transcripción y GRK5 o bien la construcción GRK5-K215R (el mutante de GRK5 sin actividad quinasa, para evitar posibles efectos colaterales de fosforilación de sustratos por esta quinasa). Pudimos determinar que **un aumento en los niveles de GRK5 puede inhibir parcialmente la inducción del elemento de respuesta a suero (SRE) mediada por G_{12} QL (figura 2)**. La inhibición observada se da al nivel de $G\alpha_{12}$ QL, y no por debajo de $G\alpha_{12}$ en esta vía de señalización, ya que la activación del SRE mediada por RhoAQL, como control de un activador de la ruta por debajo de G_{12} , no se ve afectada.

Por otro lado, la reorganización del citoesqueleto de actina de manera dependiente de ácido lisofosfatídico (LPA) es un proceso para el que está bien establecido su dependencia de la familia de proteínas $G\alpha_{12/13}$ en diferentes tipos celulares.

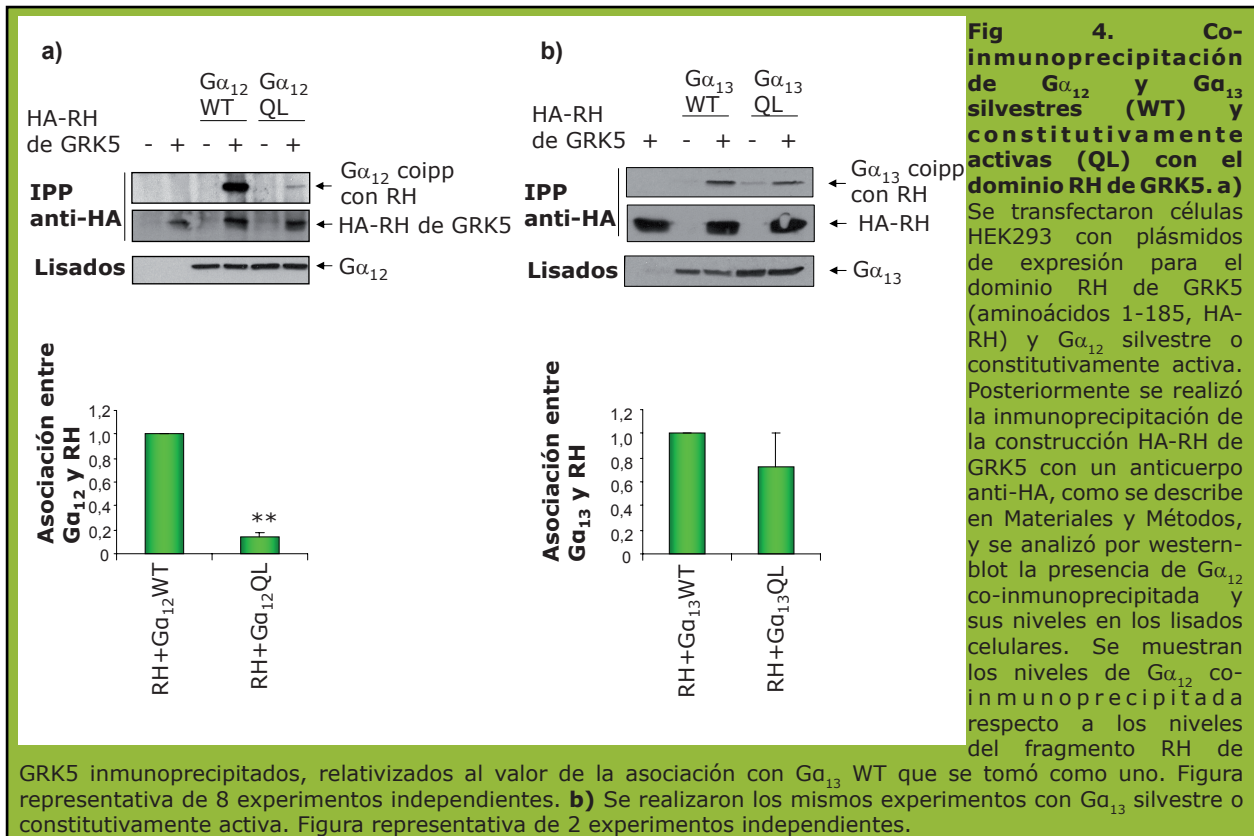
Datos preliminares muestran (**figura 3**) que cuando se transfecta el control hGFP, en el 60% de las células se detectan fibras de estrés tras tratamiento con LPA. Sin embargo, sólo el 30% de las células transfectadas



con GRK5 presentan fibras de estrés en estas condiciones. Por tanto, estos datos preliminares parecen indicar que **elevados niveles de GRK5 pueden inhibir también otro proceso dependientes de $G\alpha_{12/13}$, como es la formación de fibras de estrés en presencia de LPA.**

1.1.3. Implicación del dominio RH de GRK5 e influencia de la fosforilación de GRK5 por ERK sobre su interacción con $G\alpha_{12}$

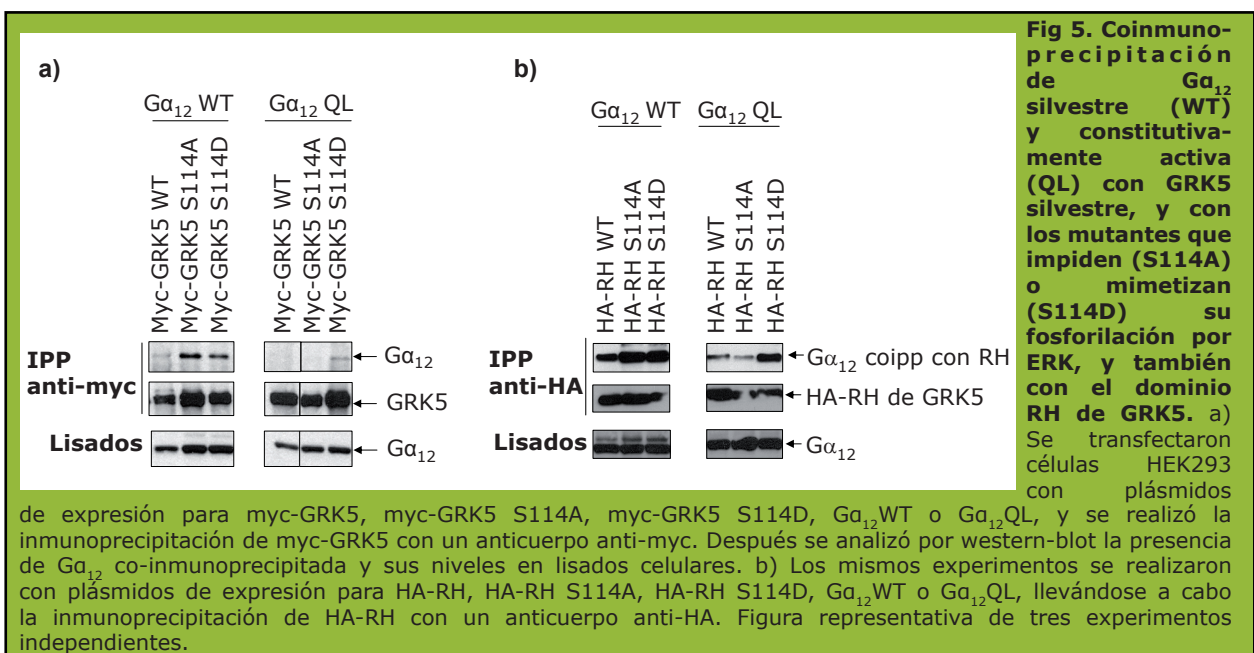
A continuación nos planteamos si el dominio RH de GRK5 era suficiente para la interacción con $G\alpha_{12/13}$, o bien era necesaria la quinasa completa. En la **figura 4** se muestra que **el dominio RH es suficiente para la interacción de GRK5 con $G\alpha_{12/13}$**



y que, al igual que ocurría con la proteína completa, la interacción depende del estado de activación de $G\alpha_{12/13}$, siendo más débil con la forma activa.

Para analizar si la fosforilación de GRK5 por ERK afecta a la interacción con $G\alpha_{12/13}$, llevamos a cabo mutagénesis dirigida para generar los mutantes GRK5-S114A y GRK5-

S114D, que impiden o imitan respectivamente la fosforilación en este residuo, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Mientras que no encontramos diferencias consistentes entre la interacción de los mutantes o la forma silvestre de GRK5 con $G\alpha_{12}$ WT (que muestra alta variabilidad entre distintos experimentos), la unión al mutante activo $G\alpha_{12}$ QL parece ser considerablemente



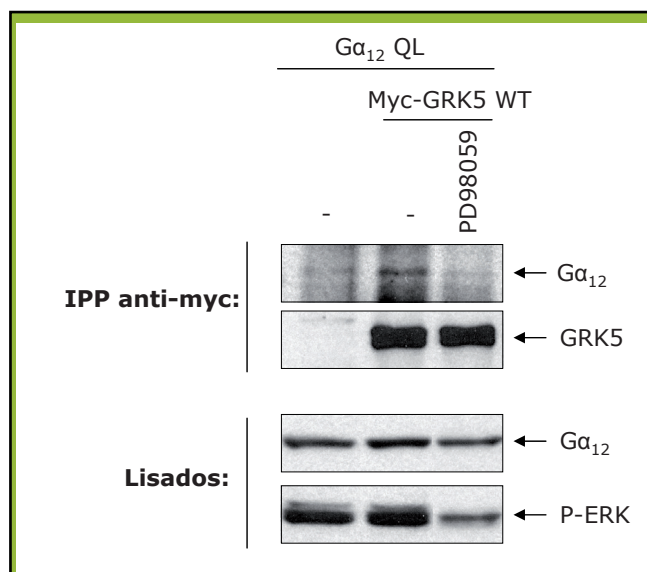


Fig 6. Modulación por el estado de activación de ERK de la interacción de GRK5 con $G\alpha_{12}$ en células. Se transfectaron células HEK293 con plásmidos de expresión para myc-GRK5 y $G\alpha_{12}$ QL, y posteriormente fueron sometidas a ayuno durante 16h. A continuación fueron tratadas con el inhibidor de la ruta MEK/ERK PD98059 10 μ M durante 5h. Se realizó entonces la inmunoprecipitación de myc-GRK5 con un anticuerpo anti-myc y se analizó por western-blot la presencia de $G\alpha_{12}$ co-inmunoprecipitada y sus niveles en lisados celulares, así como la activación de ERK. Figura representativa de dos experimentos.

superior con la construcción de GRK5 que mimetiza el estado fosforilado por ERK (**figura 5a**). La misma tendencia se observó en experimentos utilizando el dominio RH de GRK5 WT o mutante (**figura 5b**). Consistente con esta idea, al inhibir la vía de ERK1/2 en células se detecta una tendencia a que se impida la interacción entre GRK5 y $G\alpha_{12}$ QL (**figura 6**). Esto parece indicar que **la interacción de GRK5 con $G\alpha_{12}$ activa se modula en células por el estado de activación de la ruta de ERK.**

1.2. Regulación de p38 por GRK2

Datos previos del laboratorio, presentados en la tesis de la Dra. Sandra Peregrín, revelaban que **GRK2 fosforila a p38**. Esta fosforilación tiene lugar en la treonina 123, un residuo localizado en la entrada del surco de anclaje de p38 (Peregrin et al. 2006). La mutación de este residuo a Asp demostró que esta fosforilación puede interferir la activación de p38 por MKK6, así como la actividad de p38 sobre sus sustratos en experimentos *in vitro*. Por otra parte, la diferenciación de células preadipocíticas estimuladas con insulina (respuesta fisiológica dependiente

de p38) se modulaba por los niveles y la actividad de GRK2 (Peregrin et al. 2006).

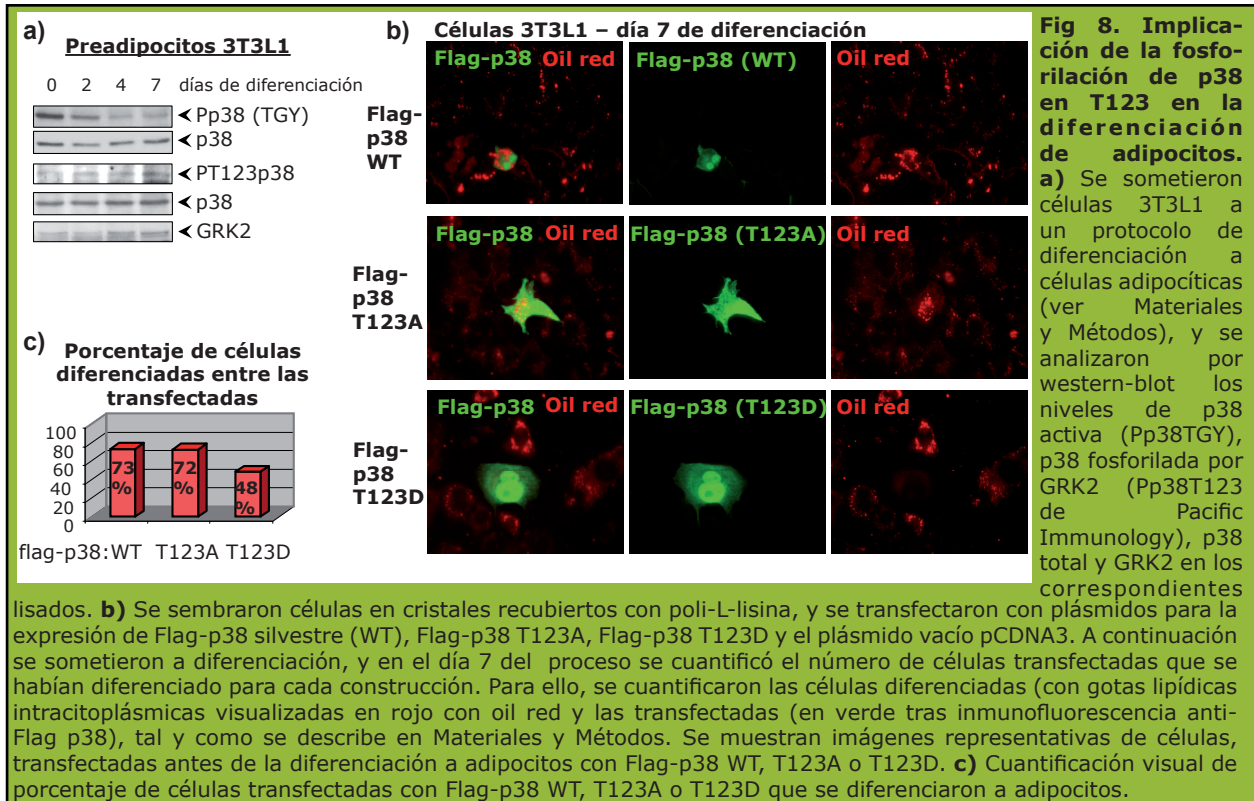
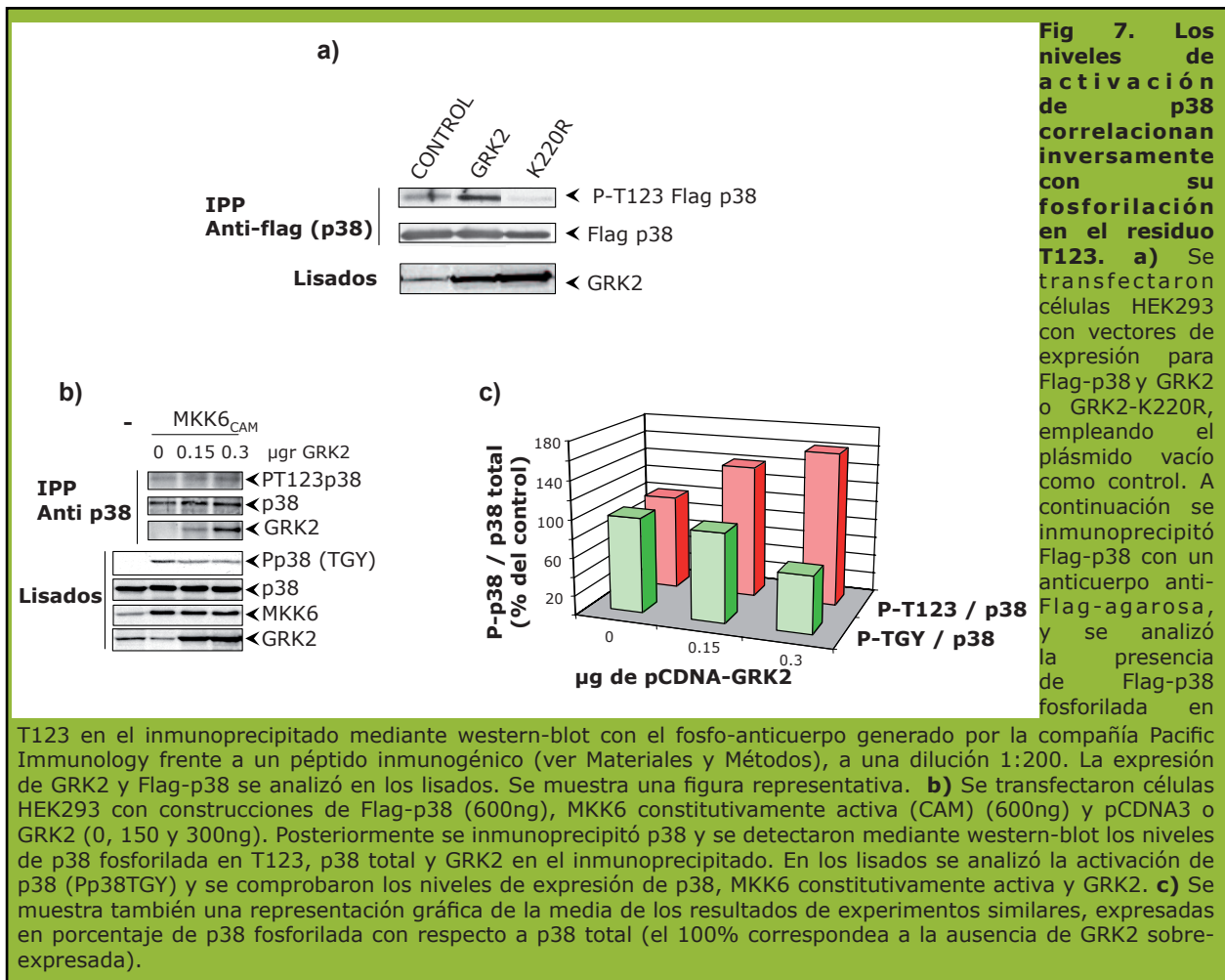
Con estos antecedentes, quisimos profundizar en el estudio de la modulación de p38 MAPK por GRK2. Para ello, generamos una batería de anticuerpos contra el epítipo fosforilado de p38 por GRK2 (T123), con la intención de disponer de herramientas moleculares apropiadas para la búsqueda de procesos fisiológicos o tipos celulares en los que pudiese estar implicada esta modulación.

1.2.1. Los niveles de activación de p38 correlacionan inversamente con su fosforilación en el residuo T123

En primer lugar, caracterizamos **un fosfo-anticuerpo generado por la compañía Pacific Immunology contra un antígeno peptídico que contiene el epítipo fosforilado por GRK2 de p38 (T123)**, mediante western-blot con células transfectadas con Flag-p38 en diferentes condiciones, para analizar si este anticuerpo detectaba la proteína p38 fosforilada en la T123 en células.

Observamos que este anticuerpo **reconoce una banda con la migración electroforética de p38 en lisados de células** transfectadas con GRK2, pero no si se transfectan con el mutante sin actividad quinasa GRK2 K220R, que utilizamos para reducir la actividad de la GRK2 endógena ya que no existen inhibidores farmacológicos selectivos y eficaces para GRK2 (Winstel et al. 2005)(**figura 7a**).

Anteriormente, en el laboratorio se había detectado que, *in vitro*, GRK2 inhibe la activación de p38 de forma dependiente de dosis, en presencia de activadores de p38 (MKK6_{CAM}). Como se observa en las **figura 7b y 7c**, esta inhibición también sucede en células. Además, la disminución de p38 activa (Pp38 fosfo-TGY) correlaciona inversamente con los niveles de p38 "inactivada" (fosforilada por GRK2 en T123) detectados por el fosfo-anticuerpo. En esta figura puede apreciarse además la co-inmunoprecipitación de GRK2 con Flag-p38, lo que indica que ambas proteínas están presentes en el mismo complejo molecular dentro de las células.



1.2.2. La diferenciación de células adipocíticas y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por macrófagos son procesos celulares dependientes de p38 que pueden ser regulados por los niveles de GRK2

A continuación utilizamos el fosfo-anticuerpo generado para estudiar dos procesos celulares que son dependientes de p38 MAPK. En primer lugar, analizamos la posible implicación de esta modulación de p38 por GRK2 en la diferenciación de células preadipocíticas NIH3T3L1 a adipocitos maduros. El proceso de diferenciación en cultivo de esta línea celular en presencia de insulina y otros factores es estrictamente dependiente de p38 y está ampliamente caracterizado: la actividad de p38 disminuye según avanza la diferenciación celular (Engelman et al. 1998; Engelman et al. 1999).

Así, se analizó la activación de p38 y su fosforilación por GRK2 en células 3T3L1 a lo largo del proceso de diferenciación adipocítica. En la **figura 8a** podemos apreciar que los niveles de p38 endógena activada (Pp38TGY) disminuyen a lo largo del proceso de diferenciación, suceso éste ya descrito en la bibliografía (Engelman et al. 1999), mientras que los niveles de p38 fosforilada en T123 aumentan de manera inversa a la inactivación de p38. Por tanto, **el descenso de los niveles de p38 activa correlaciona con el incremento de p38 fosforilada por GRK2 durante la diferenciación.**

En paralelo, se estudió el efecto de la fosforilación de p38 por GRK2 en el proceso de diferenciación de estas células. Para ello, se transfectaron células 3T3L1 con plásmidos para la expresión de Flag-p38 silvestre (WT), Flag-p38 T123A (que impide la fosforilación en ese residuo por GRK2), Flag-p38 T123D (que imita esa fosforilación) y el plásmido vacío pCDNA3. Estas células fueron sometidas al proceso de diferenciación adipocítica, y se analizó el porcentaje de células diferenciadas de entre las transfectadas con cada construcción. En la **figura 8b** se muestran tres campos representativos con células transfectadas con p38 WT, T123A o T123D que se reconocen en verde. En rojo (tinción con oil red) se muestran las células que se han diferenciado y presentan gotas lipídicas en su citosol. En

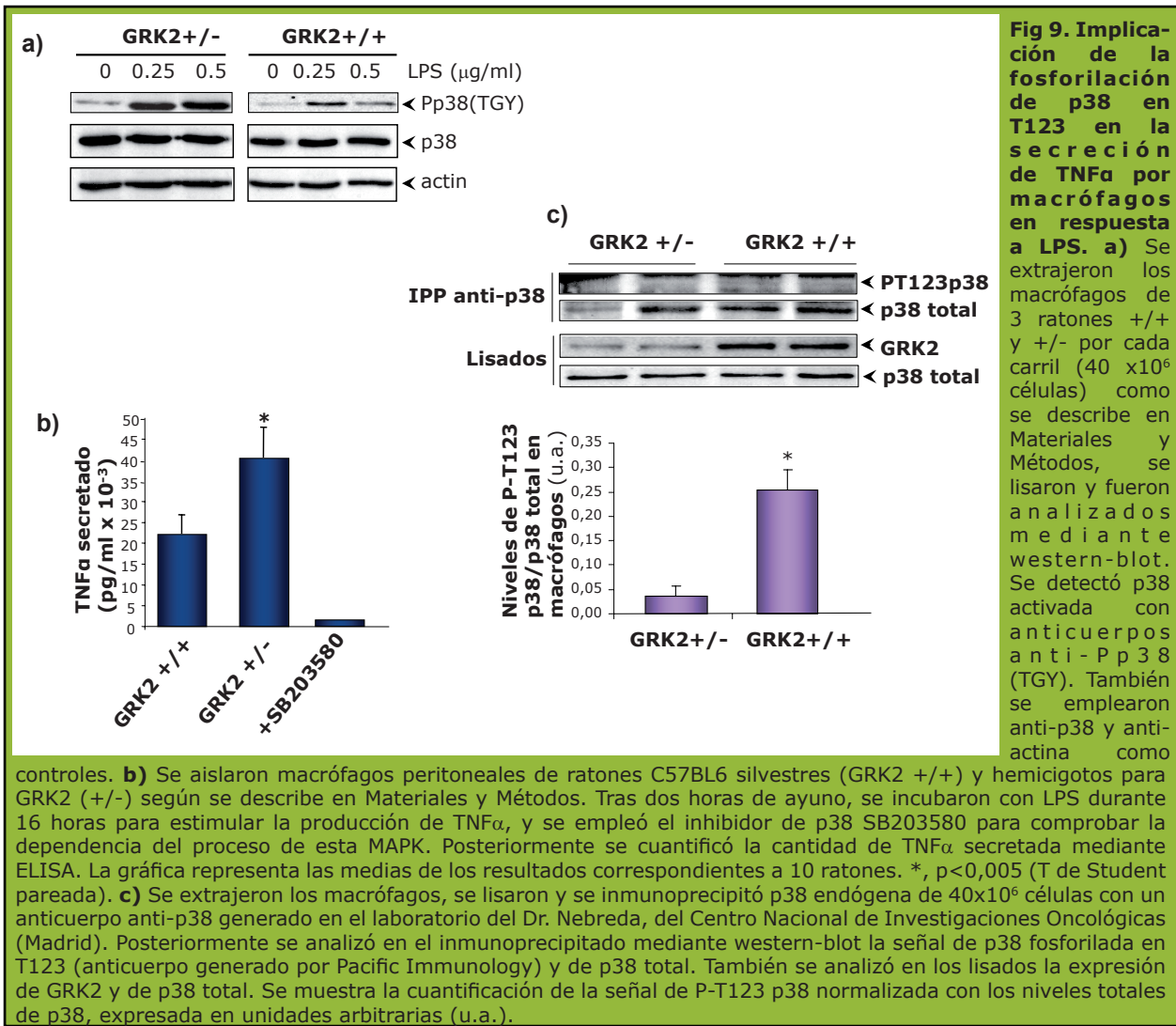
estos experimentos preliminares, se observa que las células transfectadas con p38 T123A se diferencian de manera muy similar a las transfectadas con p38 WT según lo descrito, mientras que las células transfectadas con p38T123D se diferencian en menor medida que las controles (ver cuantificación en la **figura 8c**). Por tanto, **el porcentaje de células que se diferencia a adipocitos se reduce cuando se expresa un mutante de p38 fosfo-mimético en la T123.**

En segundo lugar, se analizó la secreción de citoquinas inflamatorias por macrófagos, puesto que la secreción de $\text{TNF}\alpha$ en respuesta a LPS es un proceso estrictamente dependiente de p38 (Schafer et al. 1999). Para analizar cómo afectan los niveles de GRK2 a la activación de p38 y a la subsiguiente secreción de citoquinas inflamatorias, se aislaron macrófagos peritoneales de ratones silvestres (GRK2 +/+) y hemicigotos para GRK2 (+/-). En la **figura 9a** se muestra que los niveles de p38 activada (Pp38TGY) son significativamente mayores en macrófagos de los ratones GRK2+/-, y que la producción de $\text{TNF}\alpha$ es mayor en los ratones GRK2 +/-, con menores niveles de GRK2 (**figura 9b**). Así, **en macrófagos peritoneales GRK2 +/-, tanto la activación de p38 como la producción de $\text{TNF}\alpha$ en respuesta a LPS están incrementados.**

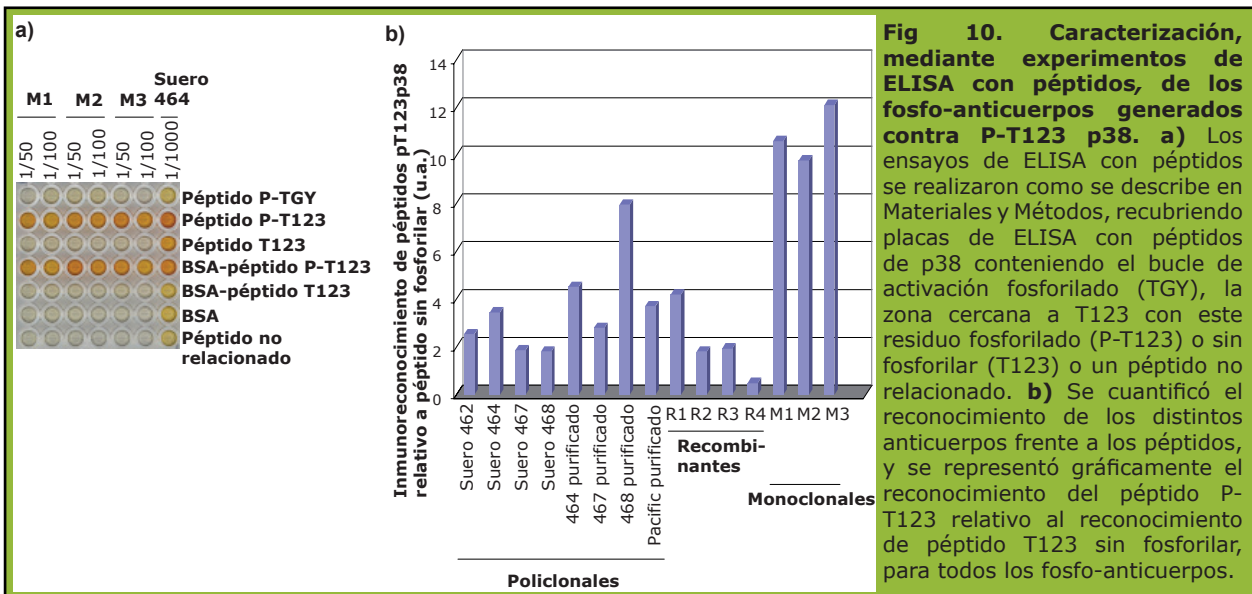
Se analizó igualmente la presencia de p38 fosforilada en T123 en ratones GRK2 +/- y +/+ de forma basal. Como se puede observar en la **figura 9c**, **se detecta una banda con el fosfo-anticuerpo contra el residuo T123 de p38 fosforilado en muestras de macrófagos** de ratones GRK2+/+ que, aunque débil, no se detecta al analizar los macrófagos de ratones GRK2 +/-, lo que es coherente con la mayor activación de la vía de p38 en estos animales.

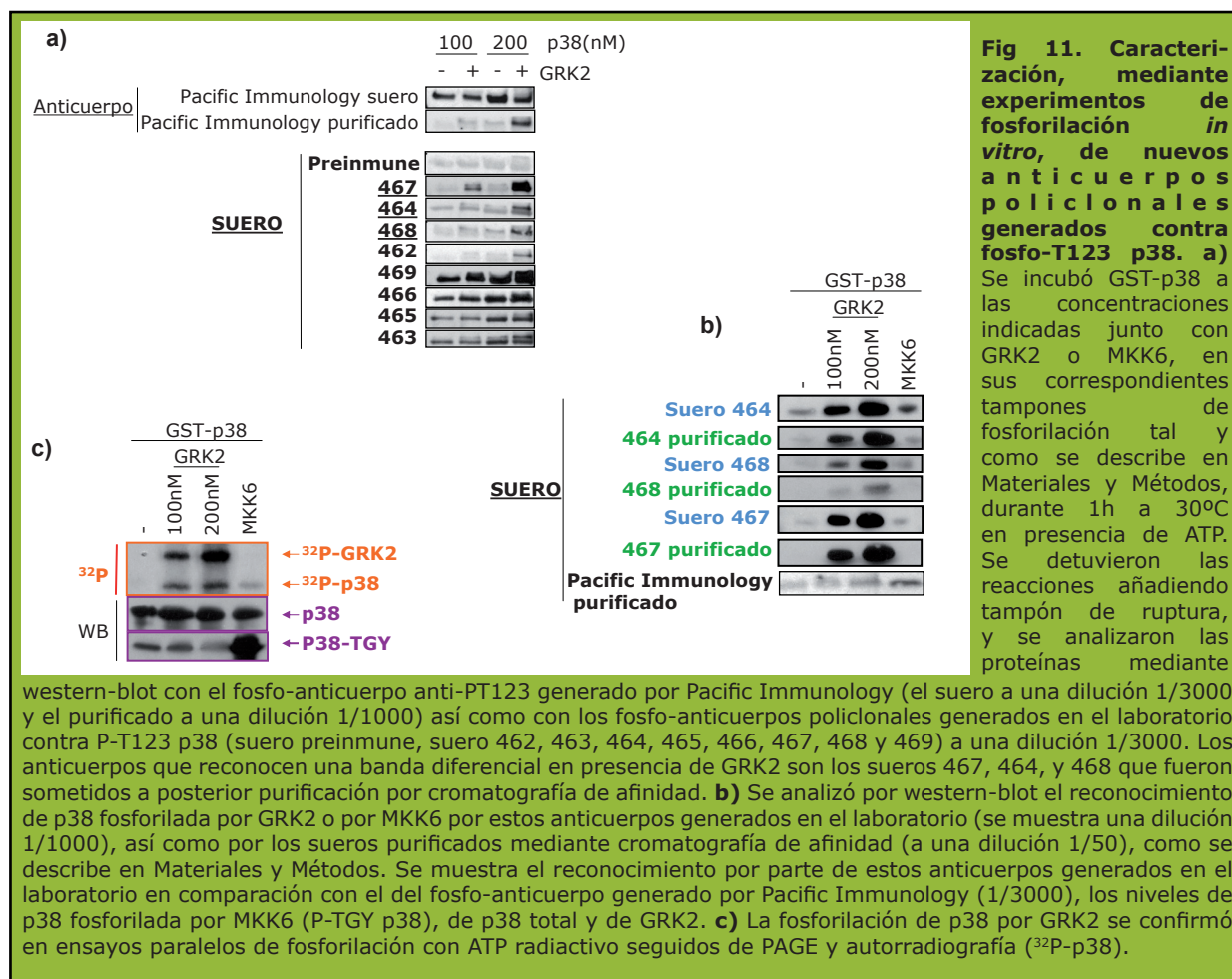
1.2.3. Caracterización de nuevos fosfo-anticuerpos generados contra P-T123 p38 para intentar mejorar la inmunodetección

Con el objetivo de mejorar la detección de la fosforilación de p38 por GRK2 en la treonina 123 para seguir investigando otros procesos fisio-patológicos en los que podría verse implicada esta nueva forma de modulación de la MAPK por GRK2, generamos una batería de anticuerpos policlonales inmunizando ocho conejos con



Materiales y Métodos.
Algunos de estos sueros fueron purificados mediante cromatografía de afinidad, primero





excluyendo la fracción de suero que se unía específicamente al péptido de p38 sin fosforilar y fosforilado por MKK6 en el sitio TGY, y segundo seleccionando la fracción de mayor afinidad hacia el péptido de p38 fosforilado en T123.

Generamos además otra batería de anticuerpos monoclonales y recombinantes contra el epítipo de p38 fosforilado por GRK2 contratando este servicio a compañías especializadas, como se describe en Materiales y Métodos, con el fin de intentar obtener herramientas de calidad para estudiar esta fosforilación utilizando diferentes técnicas.

Para caracterizar estos anticuerpos, en primer lugar realizamos **ensayos de ELISA** acoplado a las placas el péptido fosforilado en T123 como control positivo, fosforilado en el bucle de activación (TGY) como control de la especificidad, y sin fosforilar como control negativo o basal. Como se muestra en la **figura 10**, los anticuerpos **monoclonales** (M1, M2 y M3) resultaron los más eficientes

en este tipo de ensayo, aunque otros anticuerpos policlonales y recombinantes también mostraban señal específica.

Realizamos además **ensayos de inmunoreconocimiento de la p38 fosforilada *in vitro*** por GRK2 para analizar la detección de p38 recombinante fosforilada por GRK2 por parte de estos anticuerpos, así como la reactividad cruzada de estos anticuerpos con p38 fosforilada por MKK6 en el bucle TGY. De los ocho sueros policlonales generados fueron seleccionados tres por su mayor especificidad hacia p38 fosforilada por GRK2 (**figura 11a**): los sueros 464, 467 y 468, que fueron purificados por cromatografía de afinidad.

La purificación de estos anticuerpos policlonales, como se muestra en la **figura 11b**, resultó en una ganancia en especificidad dado que reconocen menos a p38 fosforilada por MKK6, pero también en una pérdida de potencia, puesto que hay que utilizarlos al menos 20 veces más concentrados que los sueros para obtener un resultado equiparable.

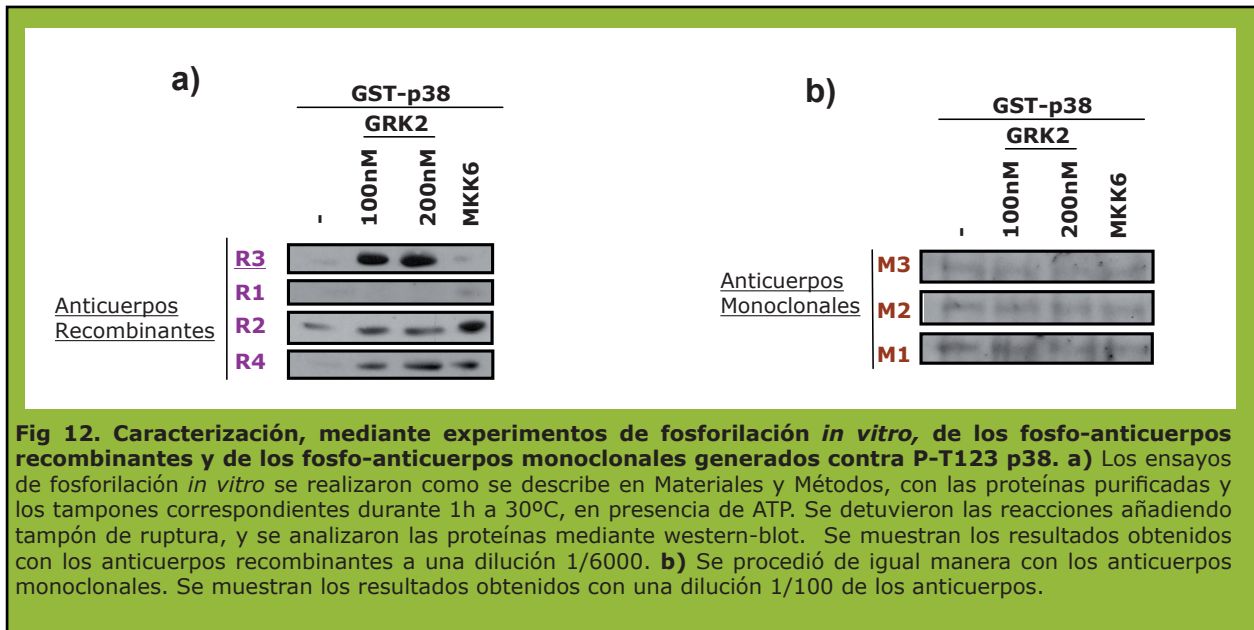


Fig 12. Caracterización, mediante experimentos de fosforilación *in vitro*, de los fosfo-anticuerpos recombinantes y de los fosfo-anticuerpos monoclonales generados contra P-T123 p38. a) Los ensayos de fosforilación *in vitro* se realizaron como se describe en Materiales y Métodos, con las proteínas purificadas y los tampones correspondientes durante 1h a 30°C, en presencia de ATP. Se detuvieron las reacciones añadiendo tampón de ruptura, y se analizaron las proteínas mediante western-blot. Se muestran los resultados obtenidos con los anticuerpos recombinantes a una dilución 1/6000. **b)** Se procedió de igual manera con los anticuerpos monoclonales. Se muestran los resultados obtenidos con una dilución 1/100 de los anticuerpos.

La comparación de estos resultados con los obtenidos empleando el fosfo-anticuerpo generado por Pacific Immunology muestra que obtuvimos una notable mejora, tanto a nivel de reconocimiento específico de la proteína fosforilada por GRK2 como a la hora de evitar el reconocimiento de p38 fosforilada por MKK6. El mejor resultado lo obtuvimos con el **suero 467**.

Los anticuerpos humanizados recombinantes R1, R2, R3 y R4 se analizaron en western-blot con p38 recombinante fosforilada o no *in vitro* por GRK2 y MKK6 (**figura 12a**), y de ellos obtuvimos un mejor resultado en cuanto a especificidad y selectividad hacia p38 fosforilada por GRK2 con el anticuerpo **R3**. En cuanto a los anticuerpos monoclonales, no conseguimos obtener prácticamente señal en western-blot con p38 recombinante fosforilada *in vitro* (**figura 12b**), a pesar de ser los anticuerpos con mejores resultados en cuanto a especificidad y selectividad al ser utilizados en ELISA con péptidos, como se mostró anteriormente.

1.2.4. Búsqueda de procesos celulares o tejidos en los que se detecte la fosforilación de p38 por GRK2

Valiéndonos de las nuevas herramientas generadas para detectar la fosforilación de p38 por GRK2, realizamos una búsqueda para intentar identificar procesos celulares, además de la diferenciación de adipocitos y la secreción de citoquinas inflamatorias, en los que esta modulación pudiera estar

teniendo lugar.

En primer lugar, y puesto que se ha descrito una inhibición de p38 en el progreso de la enfermedad coronaria a partir de hipertrofia (Lemke et al. 2001; Communal et al. 2002) y un incremento en paralelo de los niveles de GRK2 durante las patologías cardíacas (Gros et al. 1997), nos propusimos investigar si la fosforilación de p38 en la T123 podía estar teniendo lugar **en cardiomiocitos o en tejido cardíaco**, utilizando lisados de cardiomiocitos de rata H9c2 estimulados con distintos compuestos.

Puesto que está descrito que las respuestas tróficas del corazón a incrementos en el estrés de la pared cardíaca implican señalización por Angiotensina II, y que estas respuestas tróficas pueden también ser inducidas por estimulación simpática (Leenen et al. 2001), decidimos estimular estos cardiomiocitos con Angiotensina II y con Isoproterenol, un agonista β -adrenérgico, así como con el mensajero vasoconstrictor endotelina 1, elevado en situación de fallo cardíaco congestivo (Sutsch et al. 1999), o la doxorubicina, fármaco antitumoral que induce daño cardíaco (Chen et al. 2001).

En esta línea de cardiomiocitos detectamos una banda de la migración electroforética adecuada con los fosfo-anticuerpos anti p-T123 p38, si bien ésta no se modifica significativamente en respuesta a diferentes estímulos a tiempos cortos ni correlaciona

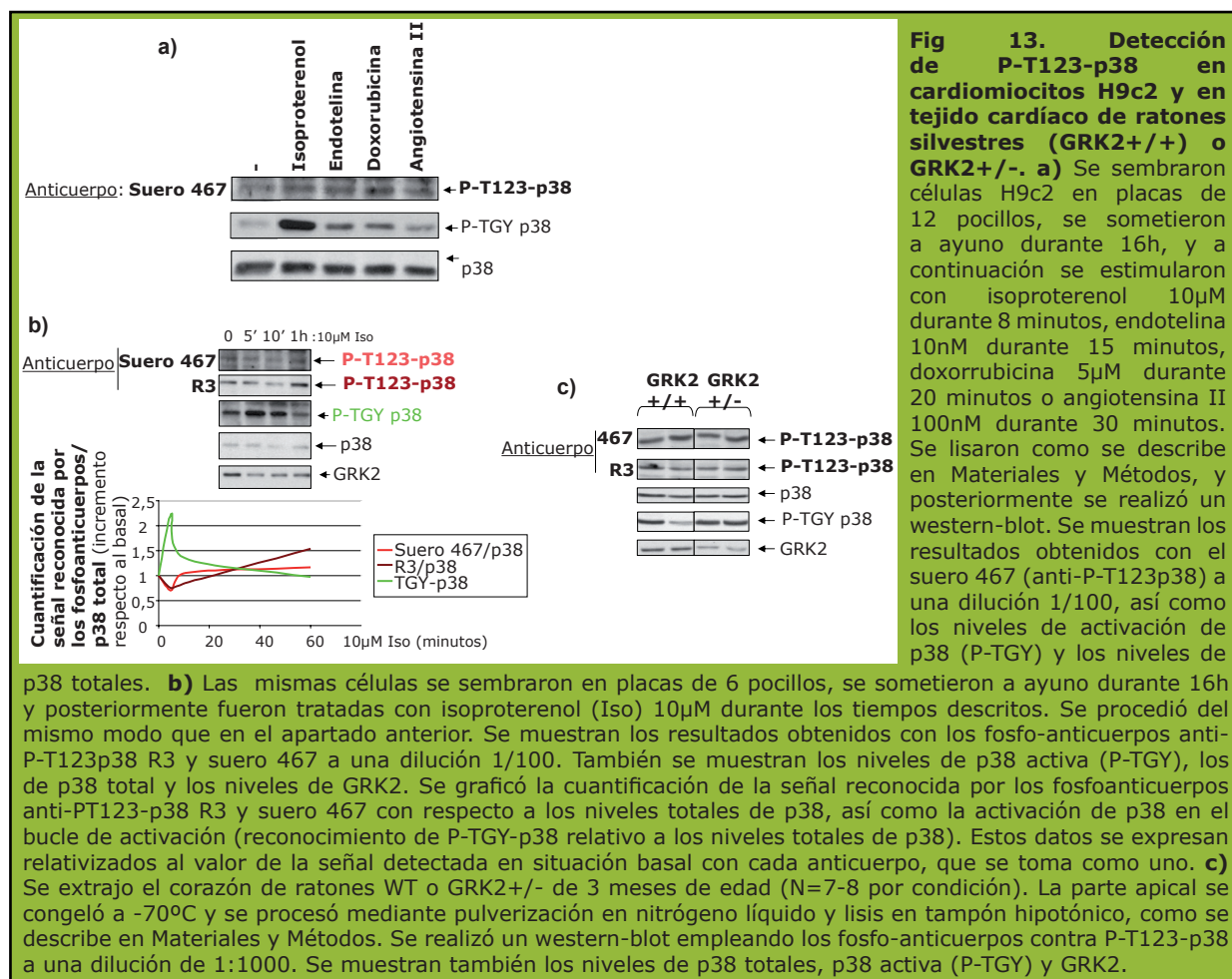


Fig 13. Detección de P-T123-p38 en cardiomiocitos H9c2 y en tejido cardíaco de ratones silvestres (GRK2+/+) o GRK2+/-. **a)** Se sembraron células H9c2 en placas de 12 pocillos, se sometieron a ayuno durante 16h, y a continuación se estimularon con isoproterenol 10 μ M durante 8 minutos, endotelina 10nM durante 15 minutos, doxorubicina 5 μ M durante 20 minutos o angiotensina II 100nM durante 30 minutos. Se lisaron como se describe en Materiales y Métodos, y posteriormente se realizó un western-blot. Se muestran los resultados obtenidos con el suero 467 (anti-P-T123p38) a una dilución 1/100, así como los niveles de activación de p38 (P-TGY) y los niveles de

inversamente con los niveles detectados de p38 activada (PTGY) (figura 13a).

Sin embargo, un estudio más detallado de la curva de estimulación con Isoproterenol en el tiempo (figura 13b), parece sugerir que existe una cierta **correlación inversa entre los niveles de p38 fosforilada por GRK2 detectados (P-T123) y los niveles de p38 activa (P-TGY), especialmente a tiempos largos** (1 hora de estimulación).

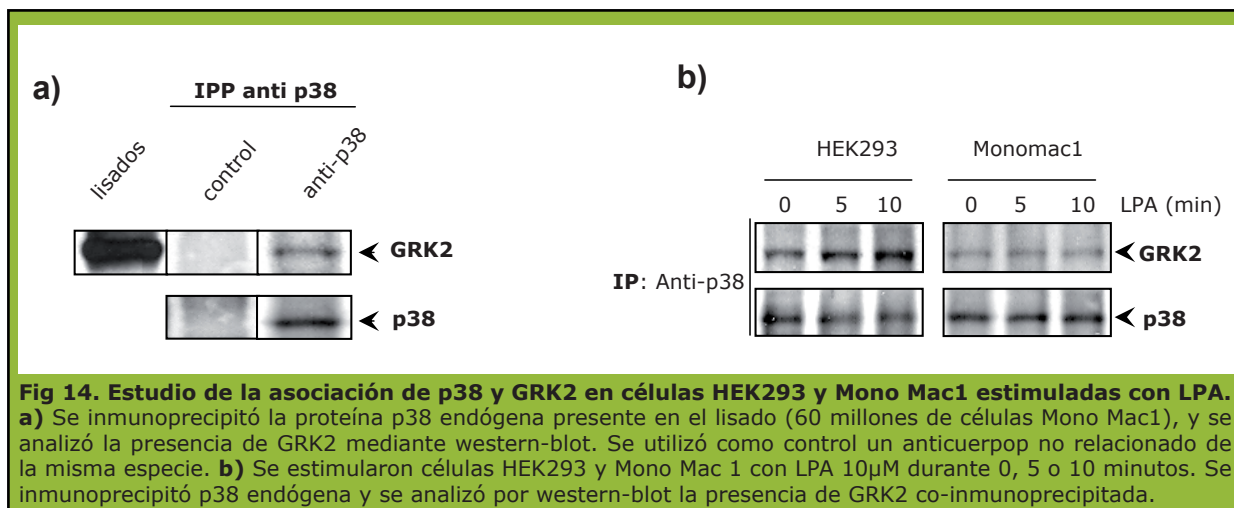
Para determinar si una alteración en los niveles de GRK2 podía estar afectando "per se" a los niveles de P-T123 p38 en células cardíacas, analizamos **tejido cardíaco** de ratones silvestres o GRK2+/- . **En situación basal, no se detectan mayores niveles de p38 fosforilada por GRK2 en los ratones silvestres con respecto a los animales GRK2+/-** (figura 13c).

Para analizar por qué los niveles de GRK2 no determinan necesariamente los niveles de P-T123-p38, quisimos estudiar si

la formación de complejos de p38 con GRK2 dependía o no de la estimulación de GPCRs. En la figura 14 se muestra que podemos detectar p38 y GRK2 endógenas en el mismo complejo molecular de manera basal en células monocíticas humanas Monomac1 o células HEK293. Al estimular estas células con LPA, principal mitógeno en el suero, que actúa mediante un GPCR, detectamos que **los efectos de la activación GPCR sobre la asociación entre p38 y GRK2 no son pronunciados y varían con el tipo celular**. Todo ello sugería la existencia de un proceso dinámico y/o modulado por otros factores adicionales.

Para ampliar la búsqueda de estímulos o situaciones en los que p38 pudiera ser fosforilada por GRK2, elegimos como modelo de estudio células epiteliales de mono Cos7, la línea celular epitelial procedente de un tumor de mama MCF7, y la línea de fibroblastos de ratón NIH3T3m1 transfectada de manera estable con el receptor muscarínico m1.

Las células Cos7 fueron estimuladas

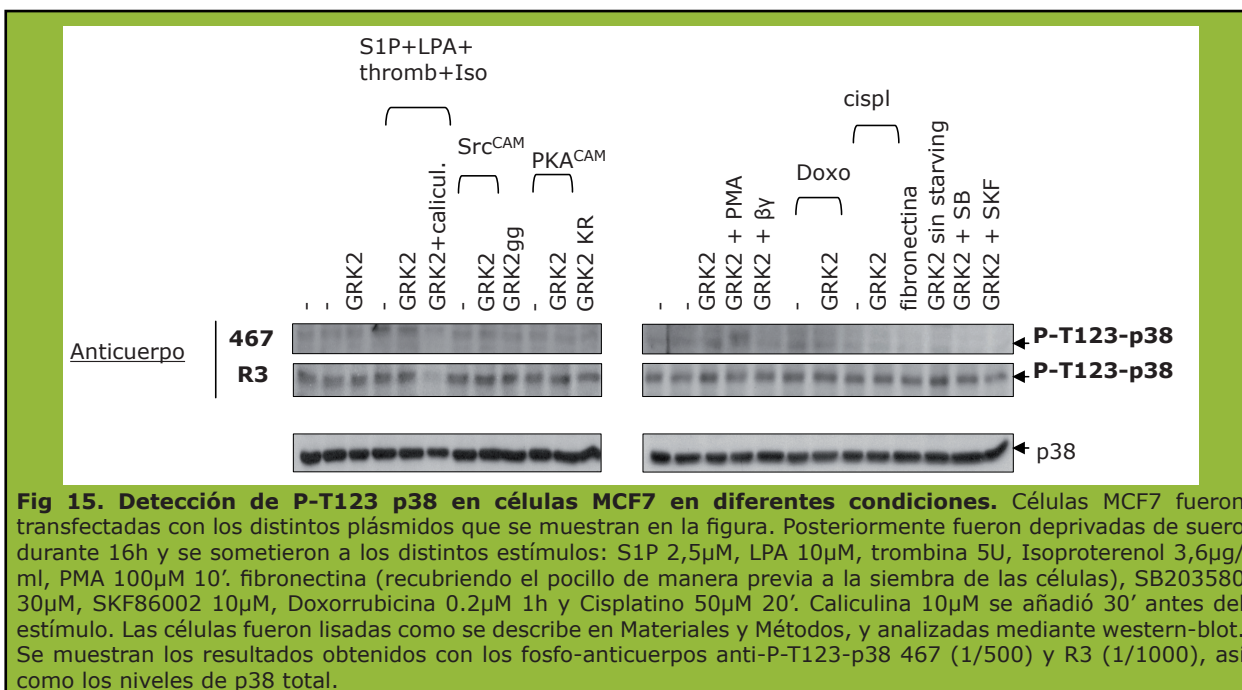


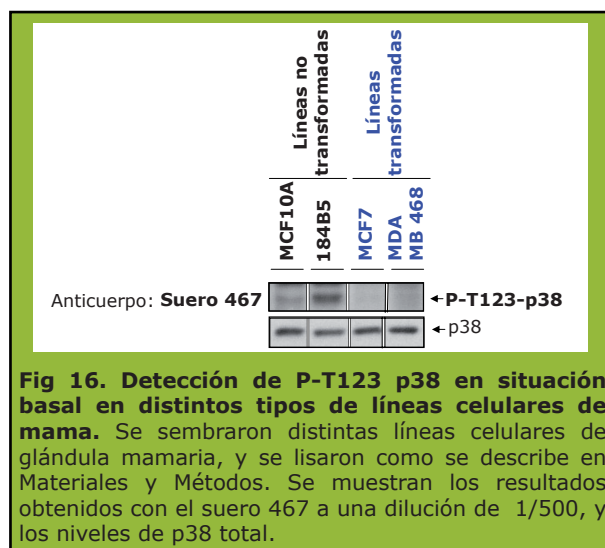
con un cocktail de ligandos de GPCR que contenía esfingosina-1-P, LPA, trombina e isoproterenol, en ausencia o presencia de GRK2 sobre-expresada y en ausencia o ausencia del inhibidor de fosfatasa caliculina, para intentar preservar la fosforilación en T123 en el caso de que ésta fuera muy transitoria. Sobre-expresamos también GRK2 en estas células junto con Src constitutivamente activa, un mutante de GRK2 que se encuentra geranil-geranilado y por tanto asociado a la membrana plasmática (GRK2gg) para analizar si esta fosforilación puede estar teniendo lugar cerca de esta sublocalización celular, y también quisimos comprobar si la activación de GRK2 por dímeros Gβγ, por la quinasa PKA o por tratamiento con PMA promovían esta

fosforilación. Considerando todos los datos obtenidos, no se observaron diferencias claras en los niveles de P-T123 p38 en ninguna de estas condiciones, correlación con los niveles de GRK2 ni correlación inversa con los niveles de p38 activa (TGY).

En **células NIH3T3m1**, comprobamos si la estimulación con carbacol, esfingosina 1-fosfato, TGF β o PDGF, entre otros estímulos, afectaba a la intensidad de la banda reconocida por los fosfo-anticuerpos contra p38 fosforilada por GRK2, pero no se encontraron cambios significativos ni correlación con p38 activa (datos no mostrados).

Por último, en **células de tumor de mama MCF7** probamos los mismos estímulos que los utilizados con células Cos7, y además





incluimos el tratamiento con doxorrubicina, cisplatino y fibronectina. Incluimos también controles con los inhibidores de p38 SB 203580, que compite por el sitio de unión al ATP de p38 y por tanto impide su actividad, y SKF 86002, un inhibidor de MKK6 y, por tanto, de la activación de p38, para descartar que la tenue banda que detectamos con los fosfo-anticuerpos fuera debida a reconocimiento de p38 activa (P-TGY). En ningún caso encontramos cambios significativos en la intensidad de las bandas detectadas por los fosfo-anticuerpos, con lo que concluimos que ninguno de estos estímulos o tratamientos está desencadenando la fosforilación de p38 por GRK2. Se muestran a modo ilustrativo los resultados obtenidos con estas células (**figura 15**).

En resumen, podemos concluir que **en ninguno de estos tipos celulares (Cos7, MCF7 y NIH3T3m1) se detectan cambios significativos en los niveles de P-T123 p38 con diversos estímulos que activan o regulan la actividad y/o la localización subcelular de GRK2.**

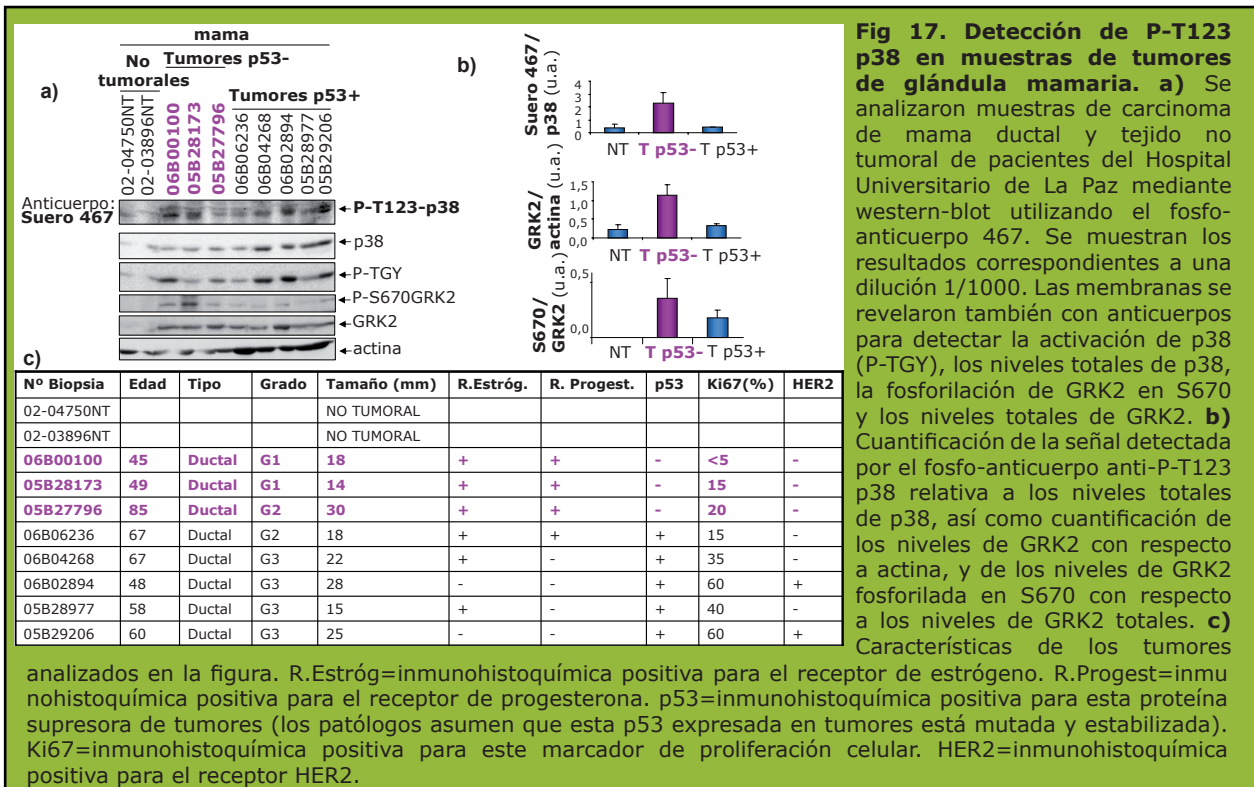
Para ampliar el estudio, realizamos una búsqueda empleando lisados de distintos tipos celulares en situación basal para detectar si la magnitud de la fosforilación de p38 por GRK2 cambiaba en algún tipo celular concreto. Comparamos mediante western blot lisados de distintas líneas celulares en situación basal (Cruz Blot A, descrito en Materiales y Métodos), y se detectaron niveles ligeramente mayores de P-T123 p38 en líneas de carcinoma de pulmón y leucemias (A431, Jurkat, A549,

BJAB, HL60, K562 o HVT78) frente a líneas procedentes de tumores del sistema nervioso o de carcinoma cervical, aunque las diferencias son poco pronunciadas (datos no mostrados). También se detectaron mayores niveles de p38 fosforilada por GRK2 en líneas **celulares no transformadas de tejido mamario**, como MCF10A y 184B5, frente a líneas de células transformadas de glándula mamaria, como MCF7 y MDA-MB-468 (**figura 16**). Sin embargo, no detectamos mayores niveles de p38 fosforilada por GRK2 en líneas celulares no transformadas de mama que sobre-expresaban GRK2 (datos no mostrados), indicando que un aumento en los niveles de GRK2 no es suficiente "per se" para desencadenar esta fosforilación.

Quisimos también determinar si, dado el relevante papel de p38 en procesos de quimiotoxicidad, la fosforilación de p38 por GRK2 pudiera estar implicada en la generación de **resistencia a agentes quimiotóxicos** por parte de células tumorales. Para ello, se realizaron experimentos utilizando células de carcinoma de ovario 2008 y las mutantes resistentes a cisplatino 2008-C13. En las primeras, la activación de p38 se mantiene en el tiempo tras el tratamiento con el quimiotóxico, mientras que en las células resistentes esta activación es mucho más transitoria (Mansouri et al. 2003). Sin embargo, no hemos detectado cambios en la fosforilación de p38 por GRK2 de uno a otro tipo celular tras el tratamiento con cisplatino (datos no mostrados).

Finalmente, analizamos si en muestras de tejido tumoral humano se detecta la fosforilación de p38 por GRK2, para lo que analizamos muestras procedentes de tumores de mama de distinto grado. En la **figura 17** se aprecian mayores niveles de fosforilación de p38 por GRK2 en un reducido conjunto de muestras de tumores p53 negativas desde el punto de vista inmuno-histoquímico. Curiosamente, en esta subpoblación se detectaron **mayores niveles de GRK2 fosforilada en S670**. Esta fosforilación de GRK2, aunque descrita como inhibitoria porque impide la unión al activador $\beta\gamma$ de GRK2 (Penela et al. 2003), podría quizá estar conduciendo a GRK2 a otra localización donde podría favorecer de algún modo la fosforilación de p38 por GRK2.

En este sentido, una situación en la



que la fosforilación de GRK2 en S670 se ve modificada es en fases concretas del **ciclo celular** (Penela et al. 2009). Algunos datos preliminares parecen indicar que la fase del ciclo celular podría ser determinante en la fosforilación de p38 por GRK2 (datos no mostrados), lo que tendrá que confirmarse en el futuro.

En resumen, si bien la fosforilación de p38 en la treonina 123 parece detectarse en diversos tipos celulares, y podría presentar variaciones en algunos tipos de células tumorales o en tumores de pacientes de cáncer de mama, el significado biológico de estos cambios y los estímulos que favorecen la fosforilación de este residuo por GRK2 (u otras quinasas) aún tienen que ser definidos.

1.3. Regulación de la ruta MEK/ERK por GRK2

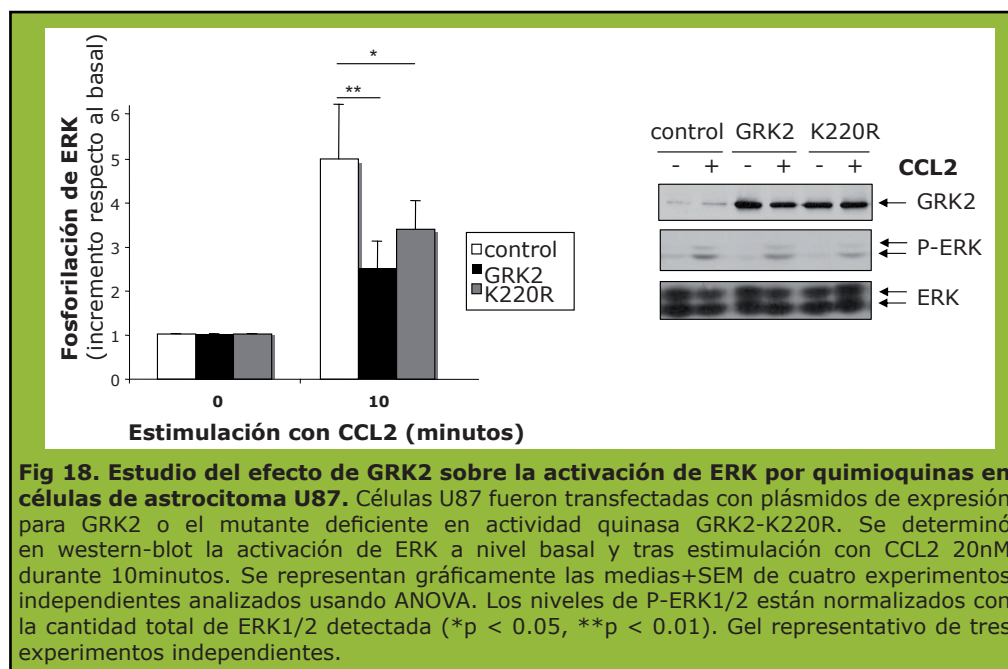
Resultados recientes de nuestro grupo apuntan a que existe una inhibición de la ruta de MEK-ERK por la quinasa GRK2 en diferentes tipos celulares que es adicional a sus efectos sobre la desensibilización de receptores (ver referencias en (Jurado-Pueyo et al. 2008)). En concreto, se describió que GRK2 inhibe la activación de ERK tras estimulación con

quimioquinas de manera independiente de la actividad quinasa de GRK2, mientras que la activación de MEK1, quinasa por encima de ERK, no se ve afectada por cambios en los niveles de GRK2. Estos resultados apuntaban a la existencia de un nuevo mecanismo de modulación de la ruta de MAPK por GRK2 a nivel de la interfase MEK/ERK (Jimenez-Sainz et al. 2006).

1.3.1. La regulación de la ruta MEK/ERK por GRK2 es independiente de su actividad quinasa

Datos previos del laboratorio, pertenecientes a la tesis doctoral de M^a Carmen Jiménez, mostraron que **GRK2 inhibe la activación de ERK sin afectar a la activación de MEK en respuesta a citoquinas (CCL2 –también llamada MCP1- y CXCL12) en células HEK293 de manera independiente de actividad quinasa**, puesto que el mutante de GRK2 sin actividad quinasa, GRK2K220R, también inhibe esta activación. Además, en **esplenocitos** procedentes de ratones GRK2+/- se detecta una mayor activación de ERK en respuesta a citoquinas, sin verse afectada la activación de MEK (Jimenez-Sainz et al. 2006).

El grupo de la Dra. Heijnen, en colaboración



con nuestro laboratorio, ha descrito que en **astrocitos** primarios tratados con IL1 β los niveles de GRK2 aumentan, mientras que la activación de ERK por CCL2 disminuye sin verse afectada la activación de MEK. De manera consecuente con estos resultados, en astrocitos de animales GRK2+/-, en los que los niveles de GRK2 están disminuidos, se observa un aumento en la activación de ERK por CCL2. Según nuestros propios resultados, esta inhibición de la activación de ERK por citoquinas en presencia de niveles elevados de GRK2 se observa también en la línea de astrocitoma U87 y es un fenómeno independiente de la actividad quinasa de GRK2, ya que la expresión del mutante GRK2K220R tiene el mismo efecto, tal y como se muestra en la **figura 18** (Kleibeuker et al. 2008).

Así pues, **GRK2 es capaz de inhibir la activación de ERK por quimioquinas de manera independiente de su actividad quinasa y este fenómeno se detecta en diferentes tipos celulares.**

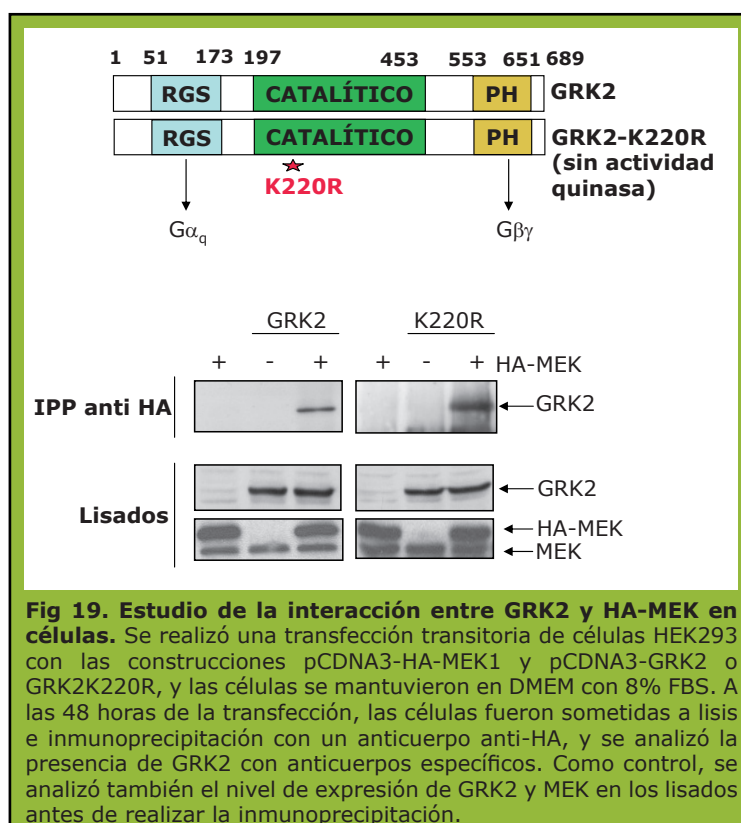
1.3.2. Estudio molecular de la regulación de la ruta MEK/ERK por GRK2

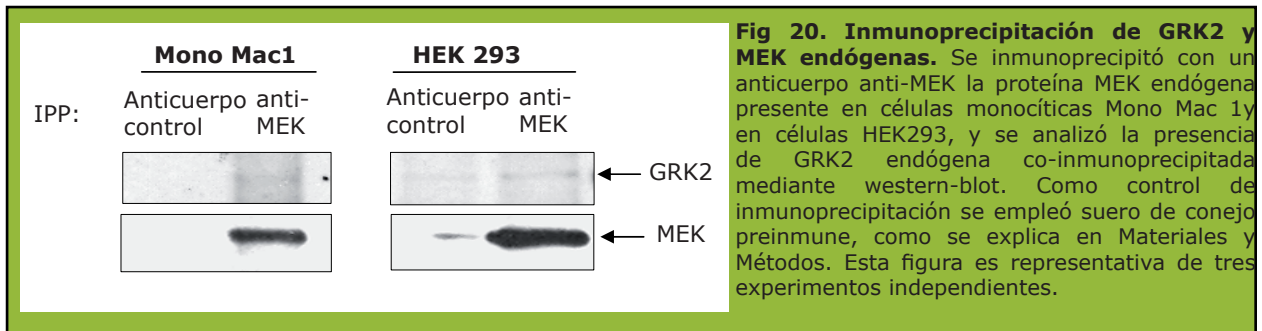
Para ahondar en el mecanismo molecular implicado, y puesto que

la fosforilación de MEK no se ve afectada, quisimos analizar si GRK2 estaba interactuando con MEK y así impidiendo la activación de ERK, en qué condiciones ocurría esto y cómo interfería GRK2 en la fosforilación de ERK por MEK.

Mediante experimentos de coimmunoprecipitación

en células HEK293 que sobre-expresaban tanto GRK2 silvestre como el mutante sin actividad quinasa (**figura 19**), pudimos observar que **GRK2 y MEK se encontraban en el mismo complejo molecular, y que la interacción de MEK con el mutante de GRK2 sin actividad quinasa (K220R) era más estable** que con GRK2 silvestre. Es





importante destacar que la asociación entre GRK2 y MEK puede también detectarse, aunque muy débilmente, **en condiciones endógenas en células Mono Mac1 y en HEK293 (figura 20).**

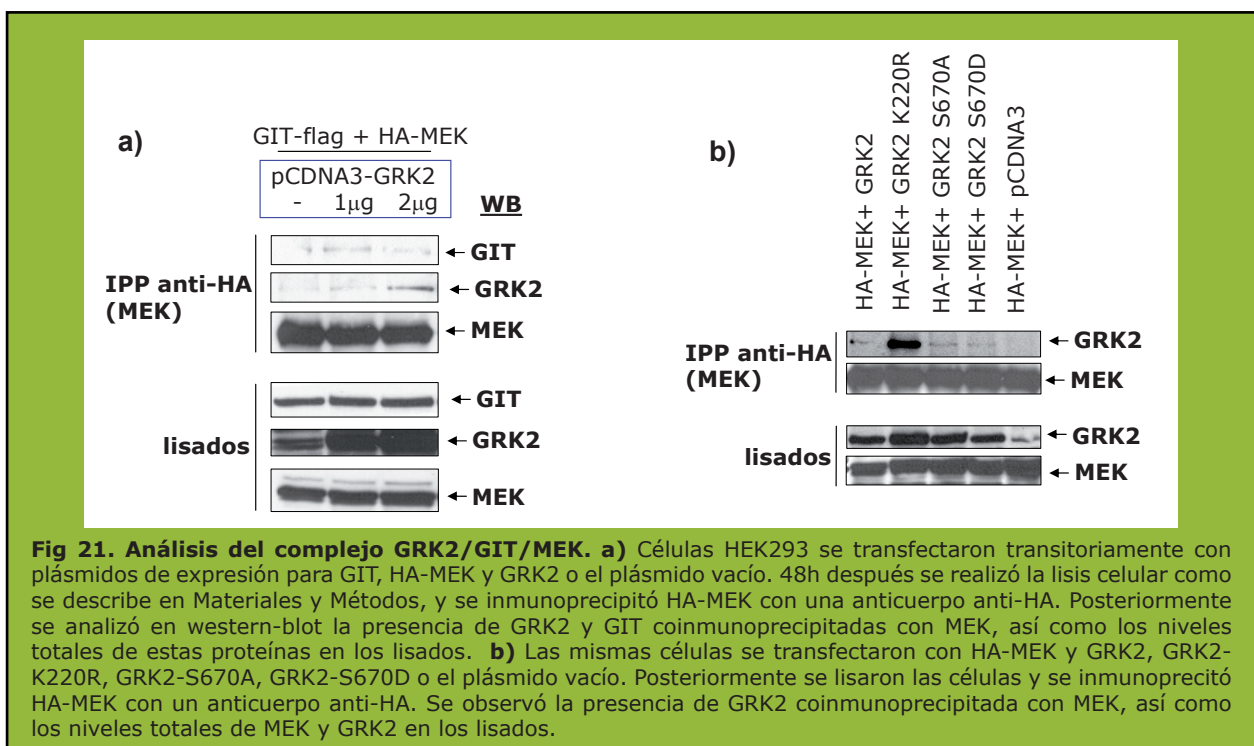
Por otro lado, se ha descrito que GIT1 (GRK-interacting protein 1) es una proteína que interacciona de manera directa con GRK2 (Premont et al. 1998), y que además actúa como proteína andamio para facilitar la activación dependiente de c-Src de MEK1-ERK1/2 en respuesta tanto a GPCRs como a receptores tirosina-quinasa (Yin et al. 2004).

Por ello, analizamos si la interacción entre GRK2 y MEK estaba teniendo lugar mediante la formación de un complejo que contuviese GIT1. Como se muestra en la **figura 21a**, **GIT1 no parece sustentar la formación del complejo GRK2-MEK** ya que la asociación que detectamos en estas

células y condiciones entre MEK y GIT es muy débil, y la mayor coimmunoprecipitación de GRK2 y MEK no lleva aparejada una mayor asociación entre MEK y GIT.

Además, utilizamos en este estudio mutantes de GRK2 que impiden o imitan su fosforilación por ERK, puesto que estos mutantes interaccionan de manera diferencial con GIT. GRK2-S670A interacciona con GIT de manera más estable que GRK2 silvestre, mientras que el mutante GRK2-S670D interacciona de manera más débil (Penela et al. 2008). Sin embargo, estos mutantes co-inmunoprecipitan con MEK de manera similar que GRK2 silvestre, como se aprecia en la **figura 21b**. Puesto que la asociación entre GRK2 y MEK no es diferente en mutantes que interaccionan de manera más o menos estable con GIT, GIT no parece estar mediando la interacción MEK-GRK2.

En este sentido, se realizaron experimentos



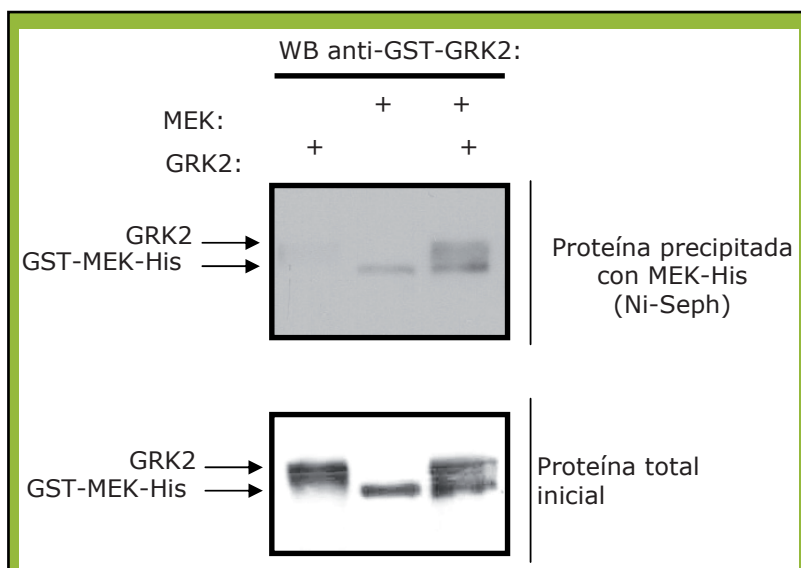


Fig 22. Análisis de una posible interacción directa entre GRK2 y MEK. Se utilizaron GST-MEK-His purificada y GRK2 recombinante purificada en el laboratorio (25nM, 80 kDa) o GST como control negativo en 15 μ l de tampón Hepes 20mM pH 7.4, MgCl₂ 5mM y NaCl 150mM 30 minutos en hielo. Tras incubación 1h en hielo con 15 μ l de resina al 50%, se precipitaron los complejos por centrifugación y se realizaron 3 lavados con 1.5 ml de tampón de interacción. La cantidad de GRK2 precipitada en cada condición se reveló con anti GST/GRK2 (PF2), que también detectaba la proteína GST-MEK-His en el sedimento.

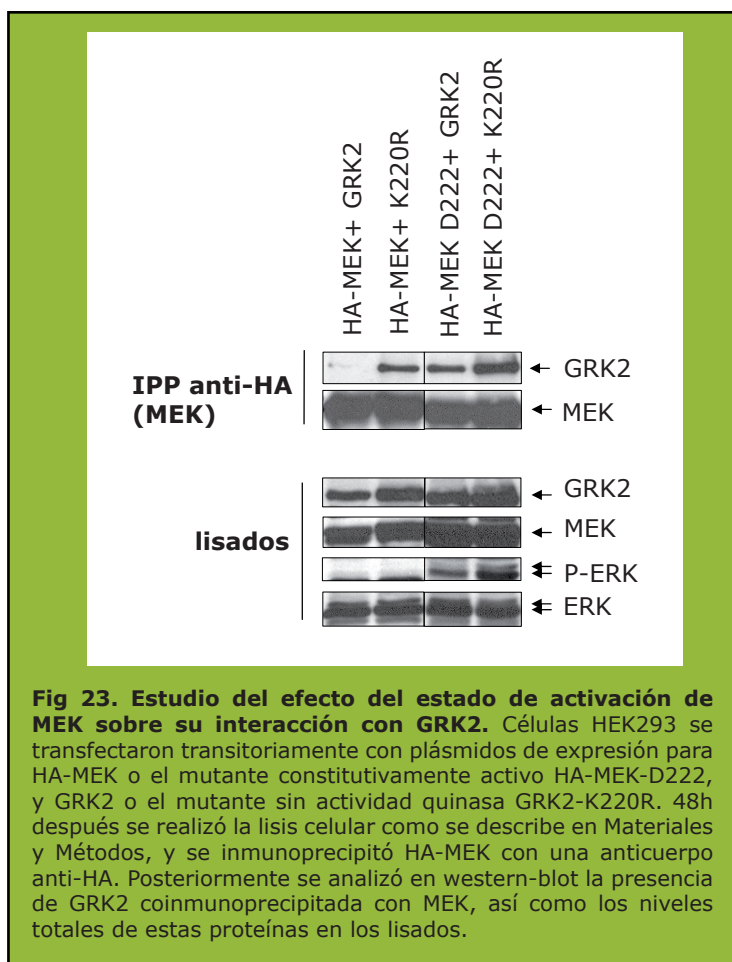
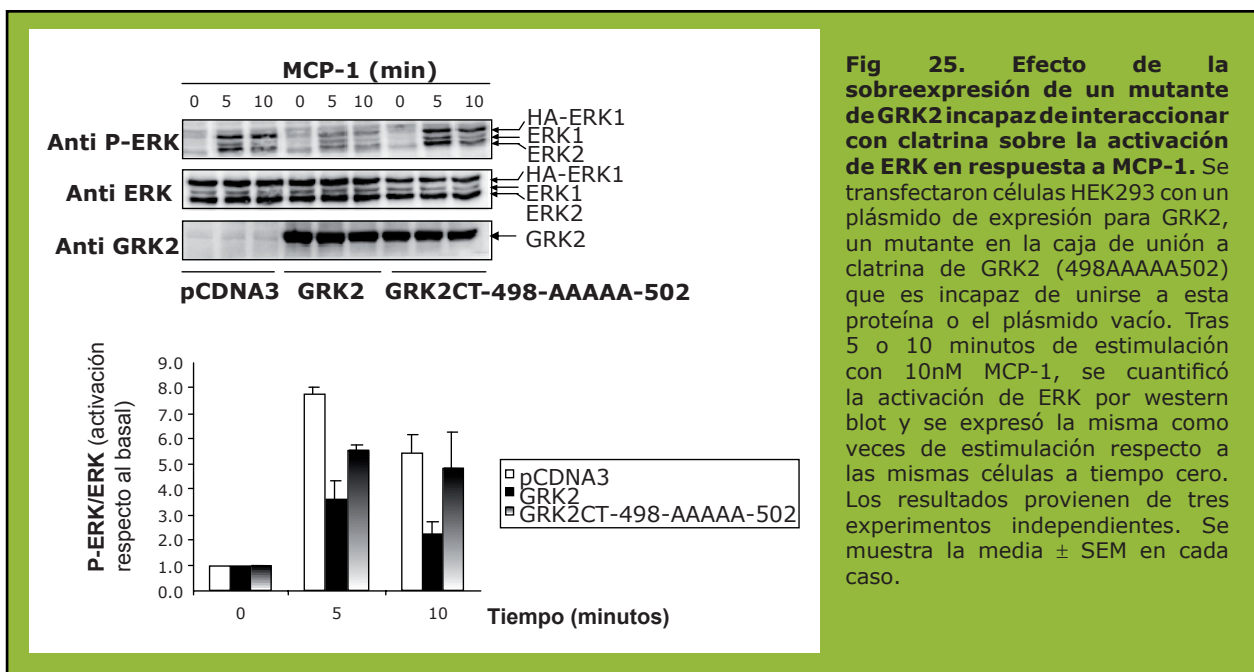
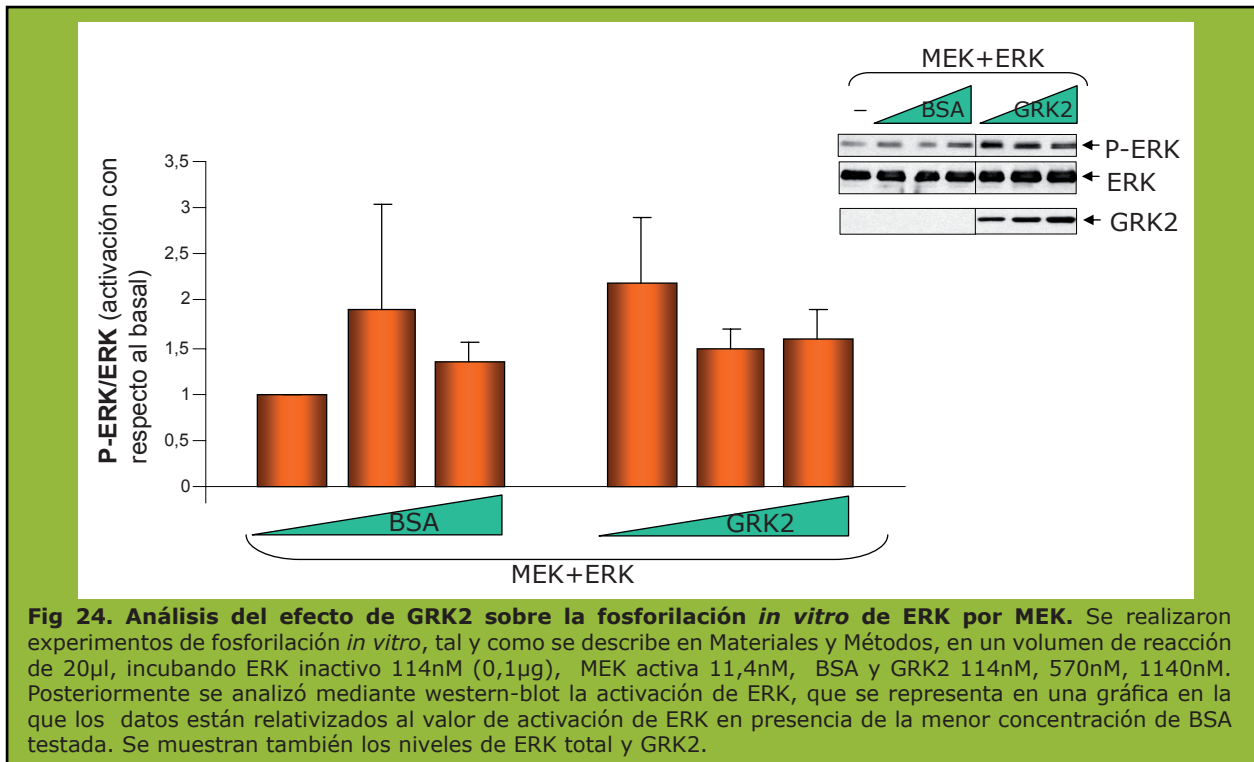


Fig 23. Estudio del efecto del estado de activación de MEK sobre su interacción con GRK2. Células HEK293 se transfectoron transitoriamente con plásmidos de expresión para HA-MEK o el mutante constitutivamente activo HA-MEK-D222, y GRK2 o el mutante sin actividad quinasa GRK2-K220R. 48h después se realizó la lisis celular como se describe en Materiales y Métodos, y se inmunoprecipitó HA-MEK con un anticuerpo anti-HA. Posteriormente se analizó en western-blot la presencia de GRK2 coimmunoprecipitada con MEK, así como los niveles totales de estas proteínas en los lisados.

de sedimentación (pull down) con MEK unida a histidinas y GRK2 purificadas, y utilizando una resina de afinidad hacia la cola de histidinas. En la **figura 22** se observa que GRK2 interacciona *in vitro* de manera específica con MEK purificada, indicando que **la interacción es directa**.

Quisimos investigar a continuación si la interacción entre GRK2 y MEK dependía del estado de activación de MEK. Para ello expresamos MEK silvestre o el mutante MEK-D222, constitutivamente activo, junto con GRK2 silvestre o sin actividad quinasa. Los datos reflejados en la **figura 23** indicaron que **la interacción entre GRK2 y MEK es más estable cuando MEK está activa**. En cualquiera de los dos casos, tanto con MEK silvestre como con el mutante activo, la interacción fue más estable de nuevo con el mutante de GRK2-K220R, sin actividad quinasa. Como se discutirá más adelante, es posible que GRK2 interaccione de manera preferente con MEK activa para así impedir que ésta a su vez estimule a ERK.

Para analizar si la inhibición de GRK2 de la activación de ERK por MEK se debía a un impedimento estérico, es decir, si GRK2 se une a MEK impidiendo físicamente que ésta fosforile a ERK, investigamos el efecto de los niveles de GRK2 sobre la fosforilación *in vitro* de ERK por MEK. Como se aprecia en la **figura 24**, **no se detectó ningún efecto significativo de cantidades crecientes de GRK2 sobre la fosforilación *in vitro* de ERK por MEK**. Así, parece que la inhibición observada de la activación de ERK por MEK debida a GRK2 podría ser generada, más que por un efecto estérico, por el secuestro de MEK por GRK2 en determinadas localizaciones celulares. En este sentido, es interesante destacar que



datos generados por la Dra. Anna Aragay, indicaban que un mutante de GRK2-498-AAAAA-502 al que le falta el dominio de interacción con clatrina y por tanto no es capaz de interactuar con esta molécula ni de internalizarse en vesículas recubiertas de clatrina, no es tampoco capaz de inhibir

tan eficazmente la activación de ERK en respuesta a quimioquinas (**figura 25**). Ello sugiere que **el bloqueo de la activación de ERK mediada por GRK2 probablemente requiere una localización precisa de los complejos GRK2-MEK.**

2. EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE GRK2 EN LA FUNCIÓN CARDÍACA

Como se ha descrito en la introducción, los niveles de GRK2 aumentan durante el desarrollo de cardiomiopatías desde estadios tempranos de la enfermedad, y este incremento precede al fallo cardíaco (Ping et al. 1997; Anderson et al. 1999). Los niveles de esta proteína están marcadamente incrementados durante enfermedades como el fallo cardíaco congestivo, isquemia miocárdica, hipertrofia ventricular e hipertensión (revisado en (Penela et al. 2006).

Es interesante destacar que los niveles de GRK2 se encuentran alterados tras un infarto únicamente en aquellos animales que desarrollarán fallo cardíaco evaluado por la presencia de edema pulmonar (Theilade et al. 2003). Estos datos subrayan la importancia de las GRKs como marcadores de la predisposición a la disfunción miocárdica, y apoyan la idea de que la elevación de sus niveles puede suponer un paso clave en la transición de hipertrofia compensada a la hipertrofia patológica que desemboca en fallo cardíaco (Penela et al. 2006).

La inhibición de GRKs ha sido propuesta de manera reiterada como un posible mecanismo terapéutico para el tratamiento del fallo cardíaco (revisado en (Dorn 2009);(Lymperopoulos et al. 2007)). Sin embargo, no existen hasta la fecha inhibidores farmacológicos de GRK2 que puedan ser utilizados como prueba de concepto de los beneficios cardíacos de la reducción de los niveles o actividad de esta quinasa.

Dados estos antecedentes quisimos analizar la función cardíaca de ratones hemicigotos para GRK2 (GRK2+/-), que presentan aproximadamente un 50% de reducción en los niveles de esta proteína con respecto a sus hermanos de camada silvestres, como modelo del efecto de una inhibición sistémica de GRK2 en el animal.

Así, nos planteamos realizar un estudio de la función cardíaca de animales GRK2+/- y +/+ durante el envejecimiento mediante

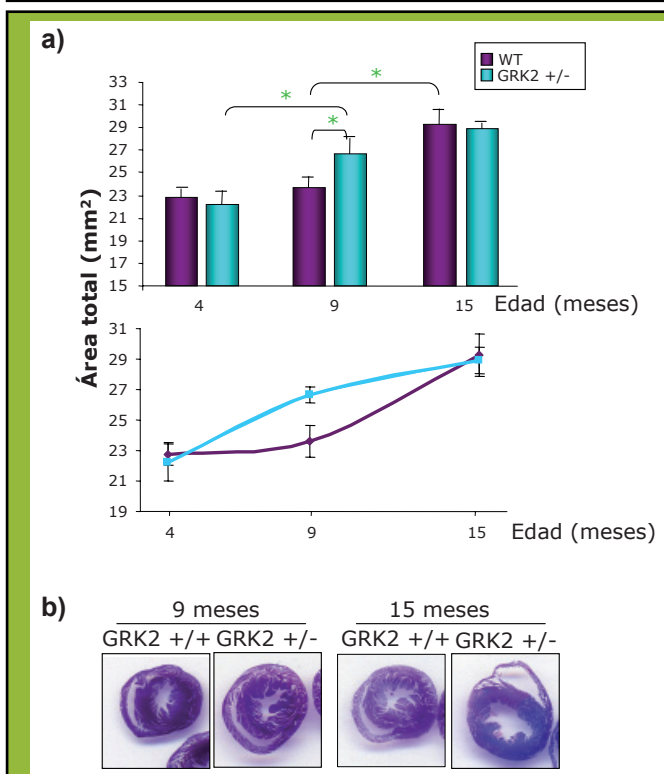
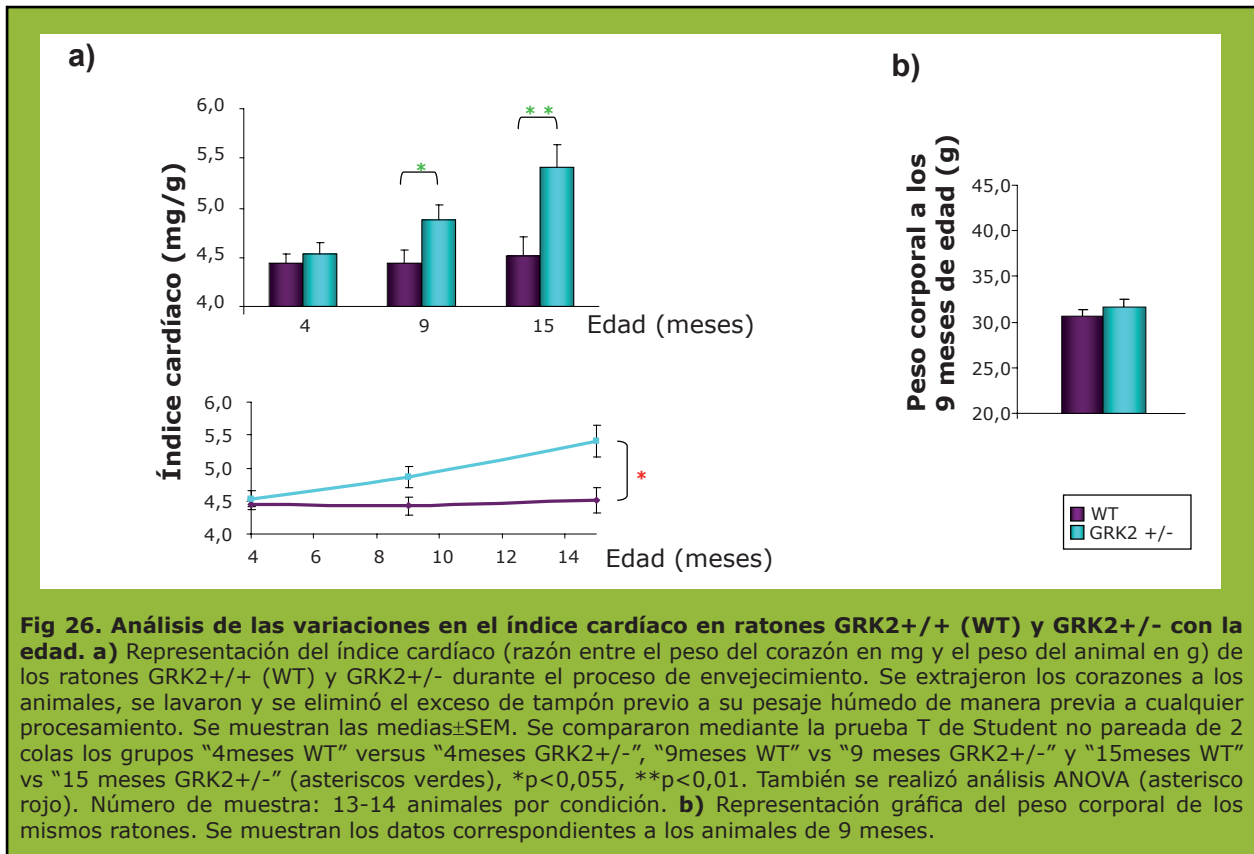
un análisis morfométrico de los corazones, un análisis ecocardiográfico, el estudio de su presión arterial, el análisis molecular del estado de las vías de señalización más importantes, así como el estudio de los cambios de expresión génica. Elegimos el proceso del envejecimiento debido a que se ha descrito que en muchos aspectos, los cambios morfológicos y funcionales que ocurren en el sistema cardiovascular con la edad y la hipertensión son similares, incluyendo hipertrofia del ventrículo izquierdo, fibrosis y disfunción (Susic et al. 2008) y porque nos pareció importante estudiar los efectos que la inhibición de GRK2 tendría sobre la funcionalidad y morfometría cardíacas a largo plazo y a nivel sistémico para imitar las condiciones de un posible tratamiento crónico con inhibidores de esta proteína.

2.1. Estudio del efecto de GRK2 en la función cardíaca en el proceso de envejecimiento

2.1.1. Estudio morfométrico del tejido cardíaco

En primer lugar analizamos el índice cardíaco, que es el cociente resultante al normalizar el peso del corazón con el peso corporal, en estos ratones. Como se observa en la **figura 26a**, el **índice cardíaco es mayor a los 9 meses en los ratones GRK2+/-, y aumenta en mayor medida en estos ratones que en los animales silvestres con la edad**. Se aprecian ya diferencias en el desarrollo de hipertrofia medida por este parámetro entre los animales WT y GRK2+/- a los 9 meses. Cabe destacar que no se detectaron diferencias significativas en el peso corporal entre estos animales WT y GRK2+/- (**figura 26b**).

El análisis detallado de los parámetros morfométricos, como caracterización más precisa de la hipertrofia cardíaca, confirma al analizar el área total del corazón en estos ratones, que los animales GRK2 +/- desarrollan antes hipertrofia cardíaca con la edad. La **figura 27** revela que **en todos los casos aumenta el área total del corazón con la edad, pero este incremento es mayor en los animales GRK2+/- que en sus hermanos silvestres a los 9 meses**. A los 15 meses de edad, el área total del corazón prácticamente se iguala en los dos



grupos.

Para estudiar en más detalle la hipertrofia cardíaca temprana observada en los ratones GRK2+/- a los 9 meses de edad, analizamos el área de sección de corte del ventrículo izquierdo (ASCVI), que representa la diferencia entre el área total del ventrículo izquierdo y el área de la cámara del ventrículo izquierdo y refleja el grosor y el tamaño de la parte tisular de este ventrículo, aportando un parámetro sólido de su grado de hipertrofia. Observamos que **el ASCVI aumenta significativamente en los animales GRK2+/- a los 9 meses, mientras que en los ratones GRK2+/+ no se detecta incremento en este parámetro (figura 28).**

El índice de crecimiento concéntrico representa el ratio entre el área de sección de corte del ventrículo

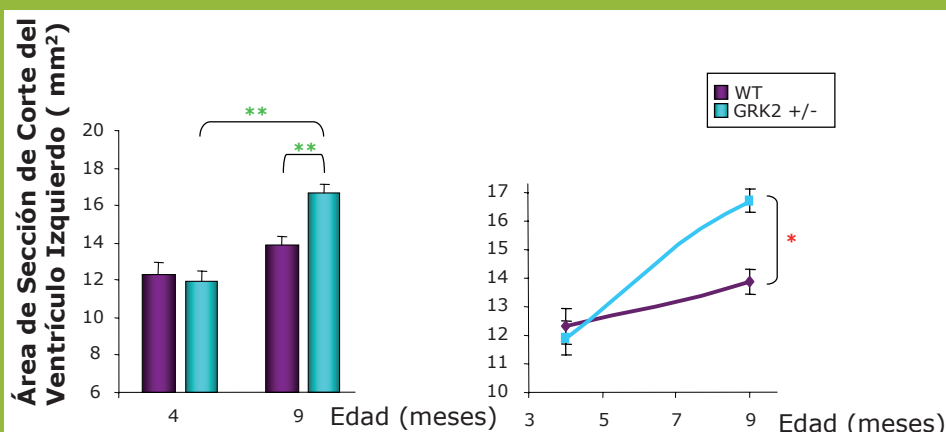


Fig 28. Análisis del área de sección de corte del ventrículo izquierdo en ratones GRK2+/+ (WT) y GRK2+/- a los 4 y a los 9 meses de edad.

Se calculó el área de sección de corte del ventrículo izquierdo, que es el área que ocupa el tejido cardíaco del ventrículo izquierdo, midiendo en cortes de corazones con el software AnalySIS® la diferencia entre el área del ventrículo izquierdo

y el área de la cámara de este ventrículo. Se analizaron 5-9 ratones por condición, y se muestran las medias+SEM. En la figura de barras se muestra la significatividad estadística al comparar mediante la prueba T de Student los distintos grupos. Asteriscos verdes, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. En la figura de líneas de tendencia se muestra la significatividad estadística analizada mediante ANOVA, asterisco rojo, * $p < 0,05$.

izquierdo y su cámara. Cuando este índice aumenta, el crecimiento observado del corazón sería de tipo concéntrico. Por el contrario, cuando este ratio disminuye indica que aumenta el área del corazón aunque el grosor de la pared del ventrículo no varíe, característica del crecimiento de tipo excéntrico del corazón. En la **figura 29** se muestra que este parámetro **aumenta hasta los 9 meses de manera similar (aunque sólo es significativo en los GRK2+/-), lo que indica que el crecimiento observado es de tipo concéntrico.**

Para comprobar si la hipertrofia observada a los 9 meses de edad en los animales GRK2+/- se acompañaba de un incremento en la fibrosis cardíaca, una condición patológica que puede contribuir a la hipertrofia cardíaca, analizamos el porcentaje de fibrosis en los cortes de corazón realizando tinciones con Rojo Sirio, que revelan depósitos de colágeno característicos del tejido fibrótico. Las medidas de la fibrosis en los cortes histológicos de corazón revelan que **el porcentaje de fibrosis aumenta de igual manera en los animales GRK2+/- y +/+ en el intervalo de los 4 a los 9 meses (figura 30)**, no detectándose diferencias significativas entre los dos grupos a los 9 meses.

Dado que el componente celular fibroblástico no parecía estar incrementado en los GRK2+/-, analizamos si la hipertrofia cardíaca observada podía deberse a un incremento en el tamaño celular de los

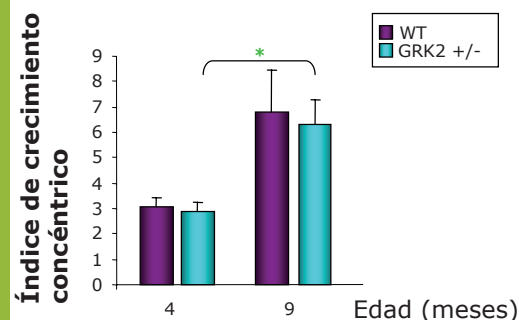


Fig 29. Análisis del índice de crecimiento concéntrico en corazón de ratones GRK2+/+ (WT) y GRK2+/- con la edad. El índice de crecimiento concéntrico se calcula como el ratio entre el área de sección de corte del ventrículo izquierdo y su cámara en diástole. Se analizaron 5-9 ratones por condición, y se representan las medias+SEM. Se muestra la significatividad estadística al comparar mediante la prueba T de Student los diferentes grupos. * $p < 0,05$.

cardiomiocitos, que se cuantifica midiendo el grosor medio de un número estadísticamente suficiente de cardiomiocitos que hayan sido objeto de un corte transversal. Como se muestra en la **figura 31**, el diámetro medio de los cardiomiocitos aumenta sólo en los animales GRK2+/- de los 4 a los 9 meses de edad de manera significativa. De estos datos podemos concluir que **la hipertrofia observada en los animales GRK2+/- a los 9 meses de edad puede ser explicada por un aumento en el tamaño de los cardiomiocitos.**

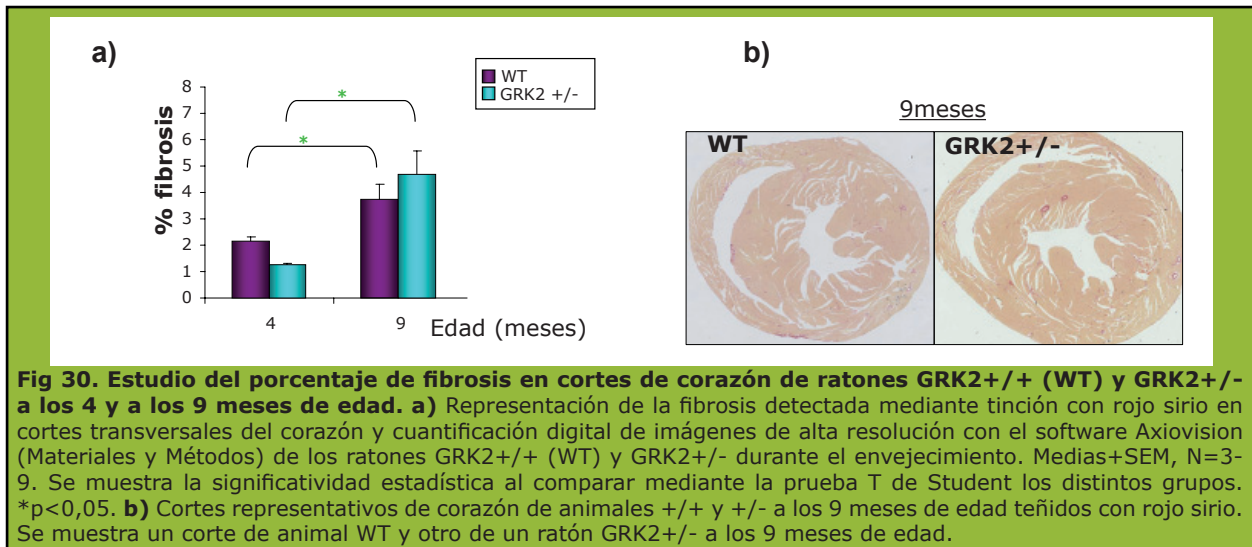


Fig 30. Estudio del porcentaje de fibrosis en cortes de corazón de ratones GRK2^{+/+} (WT) y GRK2^{+/-} a los 4 y a los 9 meses de edad. a) Representación de la fibrosis detectada mediante tinción con rojo sirio en cortes transversales del corazón y cuantificación digital de imágenes de alta resolución con el software Axiovision (Materiales y Métodos) de los ratones GRK2^{+/+} (WT) y GRK2^{+/-} durante el envejecimiento. Medias+SEM, N=3-9. Se muestra la significatividad estadística al comparar mediante la prueba T de Student los distintos grupos. *p<0,05. **b)** Cortes representativos de corazón de animales +/+ y +/- a los 9 meses de edad teñidos con rojo sirio. Se muestra un corte de animal WT y otro de un ratón GRK2^{+/-} a los 9 meses de edad.

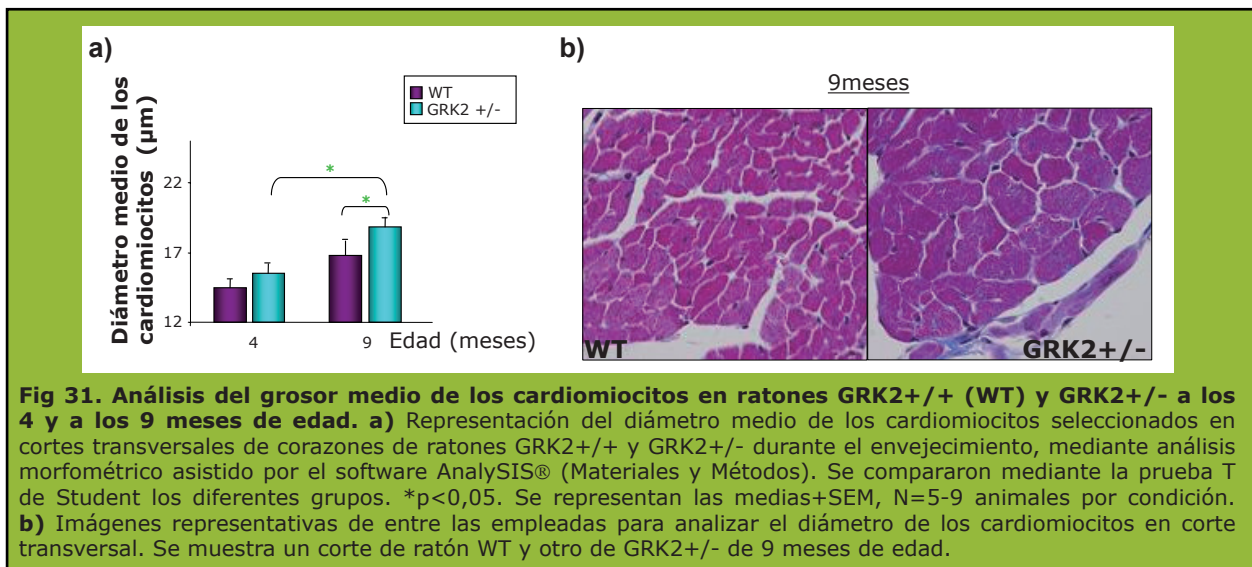


Fig 31. Análisis del grosor medio de los cardiomiocitos en ratones GRK2^{+/+} (WT) y GRK2^{+/-} a los 4 y a los 9 meses de edad. a) Representación del diámetro medio de los cardiomiocitos seleccionados en cortes transversales de corazones de ratones GRK2^{+/+} y GRK2^{+/-} durante el envejecimiento, mediante análisis morfométrico asistido por el software AnalySIS® (Materiales y Métodos). Se compararon mediante la prueba T de Student los diferentes grupos. *p<0,05. Se representan las medias+SEM, N=5-9 animales por condición. **b)** Imágenes representativas de entre las empleadas para analizar el diámetro de los cardiomiocitos en corte transversal. Se muestra un corte de ratón WT y otro de GRK2^{+/-} de 9 meses de edad.

2.1.2. Estudio ecocardiográfico

Con la intención de discernir si la hipertrofia cardíaca detectada de manera temprana en los animales GRK2^{+/-} se confirmaba por ecocardiografía y si estaba afectando a la funcionalidad del músculo cardíaco, realizamos un estudio de los ratones silvestres y GRK2^{+/-} a los 9 meses de edad, en colaboración con el Dr. Jiménez Borreguero del Hospital de la Princesa/ CNIC.

Al analizar en los ratones de 9 meses de edad los **parámetros ecocardiográficos indicadores de hipertrofia cardíaca**, se detecta (**figura 32a**) una clara tendencia a la hipertrofia cardíaca en los animales GRK2^{+/-}, fundamentalmente en lo que a la masa del ventrículo izquierdo y masa corregida de este ventrículo se refiere. También puede

apreciarse una ligera tendencia a un mayor grosor de la pared posterior en diástole.

Se analizaron posteriormente los **parámetros hallados por ecocardiografía relacionados con funcionalidad cardíaca** a los 9 meses de edad. Como se muestra en la **figura 32b**, el volumen telediastólico (volumen de sangre que se almacena en el ventrículo al final de la diástole) tiende a ser mayor en los animales GRK2^{+/-}, lo que indica que la funcionalidad contráctil no se ve reducida, sino si acaso incrementada, en los animales GRK2^{+/-} respecto a los WT. Otros parámetros como el volumen telesistólico (volumen de sangre que queda dentro del en el ventrículo al finalizar la sístole), fracción de eyección (porcentaje de volumen de sangre eyectado por el ventrículo en un ciclo cardíaco) o la fracción de acortamiento

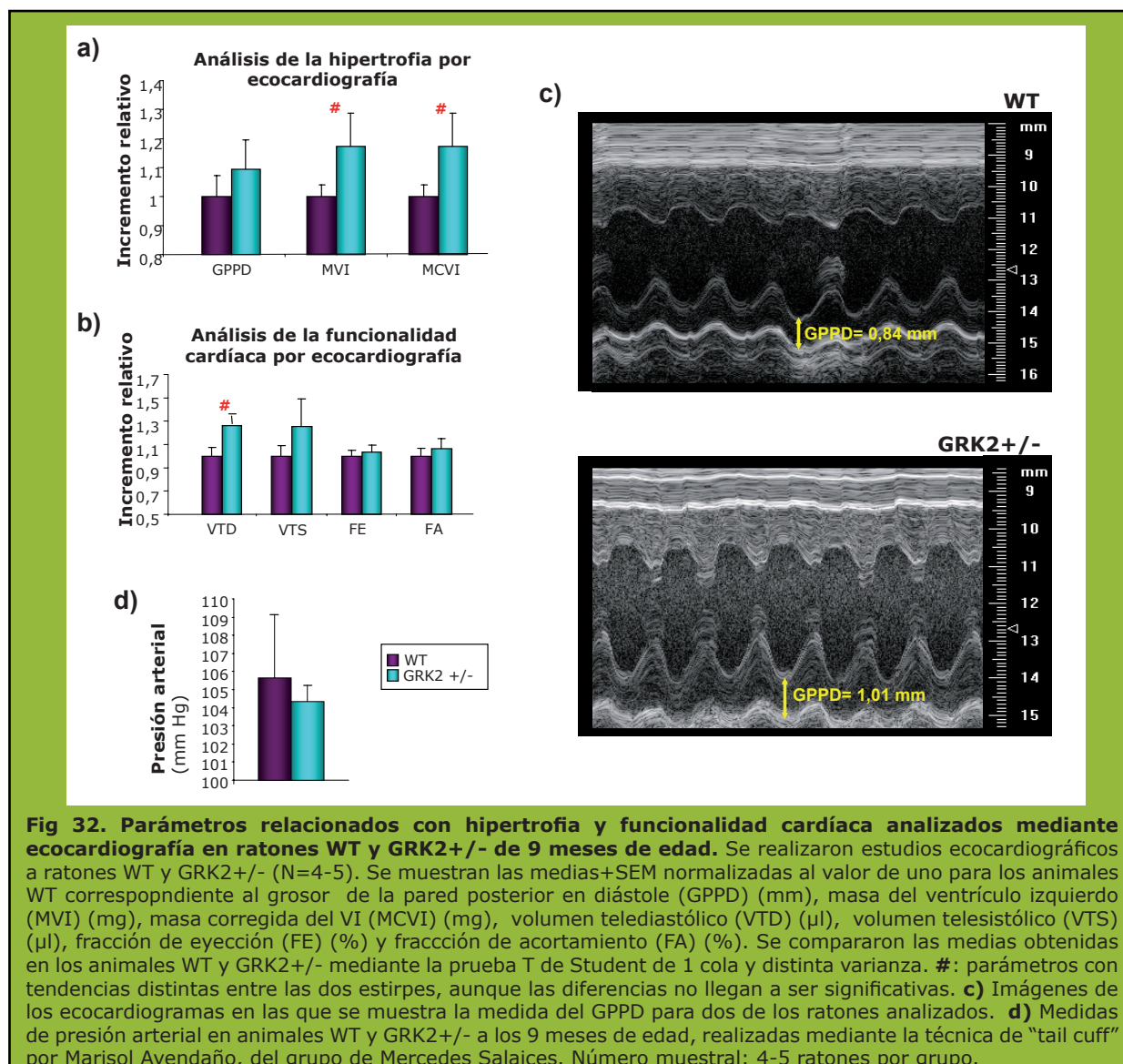


Fig 32. Parámetros relacionados con hipertrofia y funcionalidad cardíaca analizados mediante ecocardiografía en ratones WT y GRK2+/- de 9 meses de edad. Se realizaron estudios ecocardiográficos a ratones WT y GRK2+/- (N=4-5). Se muestran las medias+SEM normalizadas al valor de uno para los animales WT correspondiente al grosor de la pared posterior en diástole (GPPD) (mm), masa del ventrículo izquierdo (MVI) (mg), masa corregida del VI (MCVI) (mg), volumen telediastólico (VTD) (μ l), volumen telesistólico (VTS) (μ l), fracción de eyección (FE) (%) y fracción de acortamiento (FA) (%). Se compararon las medias obtenidas en los animales WT y GRK2+/- mediante la prueba T de Student de 1 cola y distinta varianza. #: parámetros con tendencias distintas entre las dos estirpes, aunque las diferencias no llegan a ser significativas. **c)** Imágenes de los ecocardiogramas en las que se muestra la medida del GPPD para dos de los ratones analizados. **d)** Medidas de presión arterial en animales WT y GRK2+/- a los 9 meses de edad, realizadas mediante la técnica de "tail cuff" por Marisol Avendaño, del grupo de Mercedes Salaices. Número muestral: 4-5 ratones por grupo.

(índice de cambio de dimensión del diámetro ventricular en sístole respecto a diástole) no cambian significativamente entre las dos cepas, lo cual indica que a pesar de la hipertrofia observada, la contractilidad del músculo cardíaco no ha disminuido en los ratones GRK2 +/- con la edad.

En conjunto, estos datos revelan que la hipertrofia cardíaca detectada por otras técnicas a los 9 meses en los ratones GRK2+/- y no en los WT se confirma mediante la ecocardiografía, aunque no de manera pronunciada. Es importante destacar que los resultados obtenidos mediante morfometría pueden considerarse suficientemente sólidos al abarcar un tamaño muestral mucho mayor que los estudiados ecocardiográficamente, y tratarse de una técnica bastante precisa. Sin

embargo, el estudio ecocardiográfico aporta que **esta hipertrofia no va acompañada de una disfunción cardíaca.**

2.1.3. Estudio de la presión arterial de animales WT y GRK2+/- durante el envejecimiento

Se ha sugerido en la bibliografía que la inhibición sistémica de GRK2 podría también reducir la hipertensión arterial (revisado en (Feldman 2002)) puesto que ratones con niveles disminuidos de GRK2 en células de músculo liso vascular desarrollan una menor hipertensión portal (Liu et al. 2005), y en ratones transgénicos con sobreexpresión de GRK2 en músculo liso vascular aumenta la presión arterial basal (Eckhart et al. 2002). Estos resultados pueden indicar que GRK2 estaría fosforilando y por ello inactivando de

modo preferente GPCR de tipo vasodilatador (beta-AR, adenosina, dopamina) frente a aquellos vasoconstrictores (alfa-AR, AngII, ET-1) induciendo una respuesta global del tipo hipertensivo (Feldman 2002; Harris et al. 2008), pero también puede indicar que una menor cantidad de proteína/actividad GRK2 puede estar contribuyendo a limitar el desarrollo de hipertensión por mecanismos diferentes de la fosforilación de receptores. Por otro lado, está descrito que la hipertensión arterial es uno de los desencadenantes de hipertrofia cardíaca y que en individuos hipertensos la correlación con este tipo de crecimiento del músculo cardíaco es muy alta (revisado en (Gaddam et al. 2009).

Con estos antecedentes, quisimos analizar si cambios en la presión arterial en los ratones GRK2+/- y silvestres durante el envejecimiento podrían explicar y/o contribuir al desarrollo de hipertrofia cardíaca que observamos. Para medir la tensión arterial, realizamos estudios de "tail-cuff" en colaboración con Marisol Avendaño, del grupo de la Dra. Salaices en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. **No se detectaron diferencias significativas en las medidas de presión arterial entre los animales silvestres y los GRK2+/- a los 9 meses de edad (figura 32c).**

2.1.4. Análisis del estado de activación de diferentes vías de señalización intracelular implicadas en hipertrofia cardíaca

La hipertrofia compensada de tipo fisiológico es reversible y resulta en una presión normalizada sobre las paredes del ventrículo y una compensación efectiva de la sobrecarga hemodinámica (Dorn 2007). Este tipo de hipertrofia es la que se observa tras el ejercicio sostenido y durante el embarazo, y se debe a la activación de ciertas rutas intracelulares de señalización entre las que cabe mencionar, por su importancia, la ruta de IGF-1-PI3K-akt y la de MEK1-ERK1/2-GATA-4 (Dorn et al. 2005; Barry et al. 2008).

En cuanto a las MAPK y su relación con hipertrofia cardíaca, se ha descrito que la ruta MKKK-MKK3/6-p38 MAPK antagoniza el crecimiento individual de los cardiomiocitos y promueve disfunción contráctil, mientras que la activación de ERK1/2 promueve la supervivencia de los cardiomiocitos. Además, la activación de p38 promueve un remodelado

cardíaco patológico que incluye apoptosis de cardiomiocitos y fibrosis (revisado en (Muslin 2008)).

En base a los resultados descritos hasta ahora, parecía inferirse la hipótesis de que **una inhibición sistémica y a largo plazo de GRK2 podría desembocar en la mayor activación de rutas cardioprotectoras**, como la vía de ERK1/2 o la de insulina/IGF-1/AKT, que pueden contribuir al incremento observado en la masa del corazón pero siguiendo un tipo de crecimiento compensado que no implica daño cardíaco, sino que sería de tipo cardioprotector. Quisimos pues analizar la activación de esas vías, así como de la ruta de p38 MAPK, como indicador de hipertrofia cardíaca de tipo patológico.

También quisimos estudiar en paralelo los niveles de GRK2, y algunos factores implicados en la regulación de esta quinasa, como el estado de activación de RKIP o el estado de fosforilación de GRK2 en la serina 670.

2.1.4.1. GRKs

Al analizar la evolución de los **niveles de GRK2** en los animales GRK2+/- y WT con la edad, observamos una **tendencia a que estos niveles aumenten en ambos grupos (figura 33a)**. Por el contrario, los **niveles de GRK5** no varían con la edad en los animales GRK2+/- (**figura 33b**). Esto indica que la deficiencia de GRK2 en estos animales no parece estar promoviendo la sobreexpresión de otras isoformas de GRKs presentes en tejido cardíaco que pudiesen compensar el defecto en GRK2, y que, por tanto, podemos atribuir las diferencias que detectamos a los 9 meses de edad a la disminución de GRK2.

Para profundizar en la caracterización del estado de activación de GRK2, quisimos estudiar el estado de fosforilación de la proteína inhibidora de Raf quinasa (RKIP), puesto que está descrito que RKIP fosforilada interacciona con GRK2 e inhibe su actividad quinasa. Como se muestra en la **figura 34a**, **el estado de fosforilación de RKIP no varía** ni entre ratones +/- en comparación con los +/+, ni con la edad. Sin embargo, dado que los animales GRK2+/- tienen la mitad de proteína GRK2 que los +/+, no podemos descartar que los mismos niveles relativos de p-RKIP pudieran tener un mayor efecto inhibitorio en estos animales que en

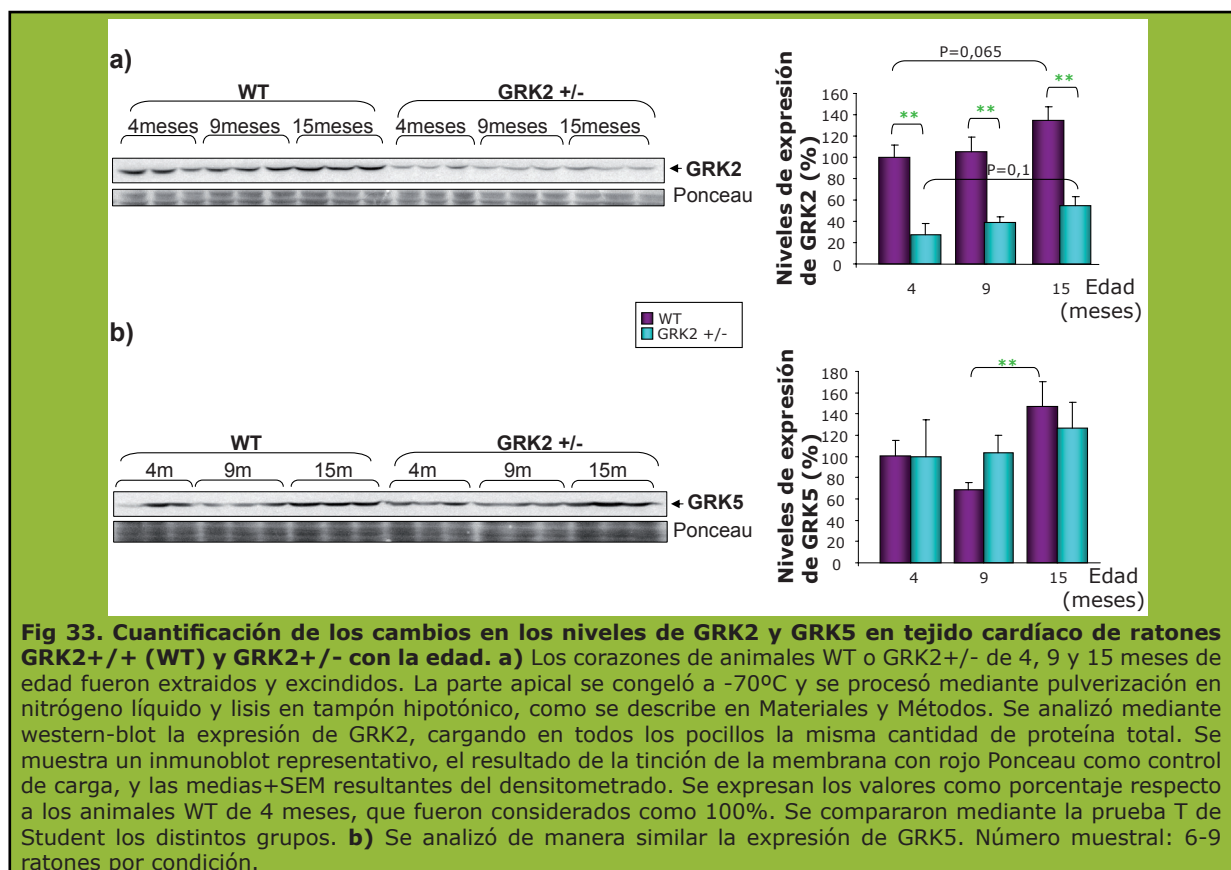
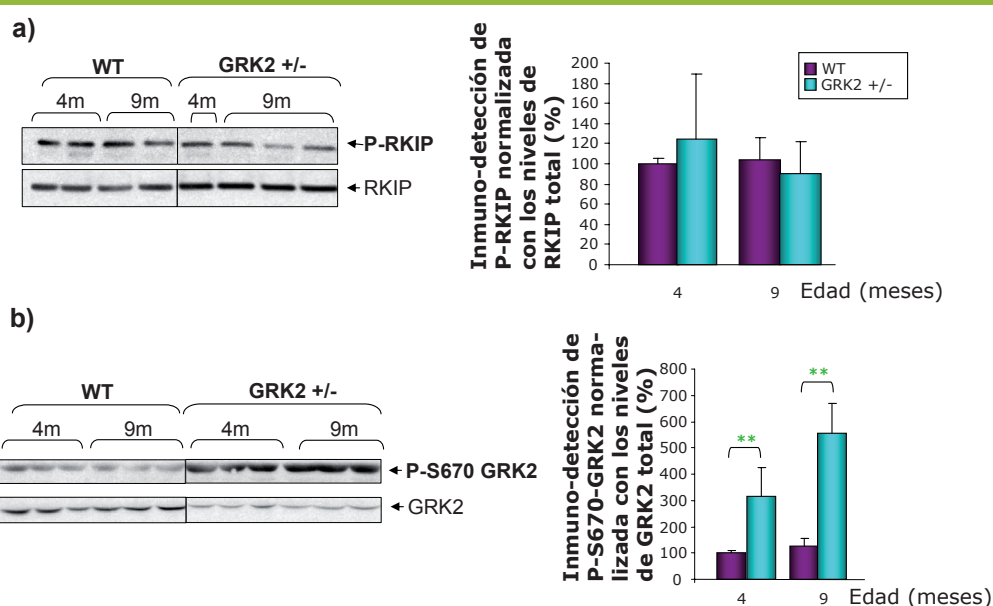


Fig 34. Estudio de la activación de RKIP y de la fosforilación de GRK2 en la serina 670 en tejido cardíaco de ratones GRK2+/+ (WT) y GRK2+/- con la edad. **a)** Se realizó el mismo tipo de análisis de la figura 33 para estudiar la fosforilación de RKIP en el corazón de animales WT y GRK2+/- de 4 y 9 meses de edad. Se muestran los niveles corregidos con



los niveles totales de RKIP, expresados en porcentaje relativo a los animales WT de 4 meses de edad, que se tomaron como 100%. **b)** Se analizó de manera similar la fosforilación de GRK2 en S670, normalizando con los niveles totales de GRK2. ** $p < 0,01$. Número muestral: 6-9 ratones por condición. Se muestran inmunoblots representativos.

los silvestres.

Por otro lado, analizamos el estado de **fosforilación de GRK2 en la serina 670**, fosforilación llevada a cabo, entre otras, por ERK MAPK, y que impide la activación de GRK2 por subunidades $G\beta\gamma$ (Pitcher et al.

1999). Como se observa en la **figura 34b**, la fosforilación en este residuo **es mayor en los animales GRK2+/- que en los ratones WT, particularmente a los 9 meses de edad**. Estos datos nos indican que, en animales +/-, no son sólo los niveles

de proteína GRK2 los que están reducidos: también la capacidad de activación de GRK2 por receptores de membrana dependientes de $G\beta\gamma$ estaría disminuida en los ratones hemicigotos.

2.1.4.2. p38 y Akt

Quisimos analizar en estos corazones los niveles de p38 activada (P-TGY) o bien modulada mediante fosforilación por GRK2 (P-T123). Como se observa en la **figura 35**, **no se detectan cambios significativos en los niveles de P-T123 p38** con la edad ni entre los animales silvestres y GRK2+/-, aunque si puede observarse una ligera tendencia a que los animales GRK2+/- presenten mayores niveles de P-T123 p38 a los 9 meses de edad, coincidiendo con una mayor fosforilación de GRK2 en S670. Sin embargo, **los niveles de p38 activada (P-TGY) disminuyen con la**

edad de forma significativa sólo en los animales silvestres.

Respecto al estado de activación de **Akt**, **no detectamos diferencias significativas en su activación**, ni entre los grupos de hermanos, ni con la edad (**figura 35c**).

2.1.4.3. MEK1/ERK1-2

La cascada de ERK es una de las vías de señalización más generalmente implicadas en hipertrofia cardíaca (Ueyama et al. 2000), y en concreto, el tipo de hipertrofia desarrollado tras sobreactivación de la vía de MEK1-ERK1/2 es de tipo compensado en modelos murinos (Bueno et al. 2000).

Al analizar el estado de activación de la ruta de MEK-ERK, observamos que **los niveles de P-ERK tienden a aumentar en**

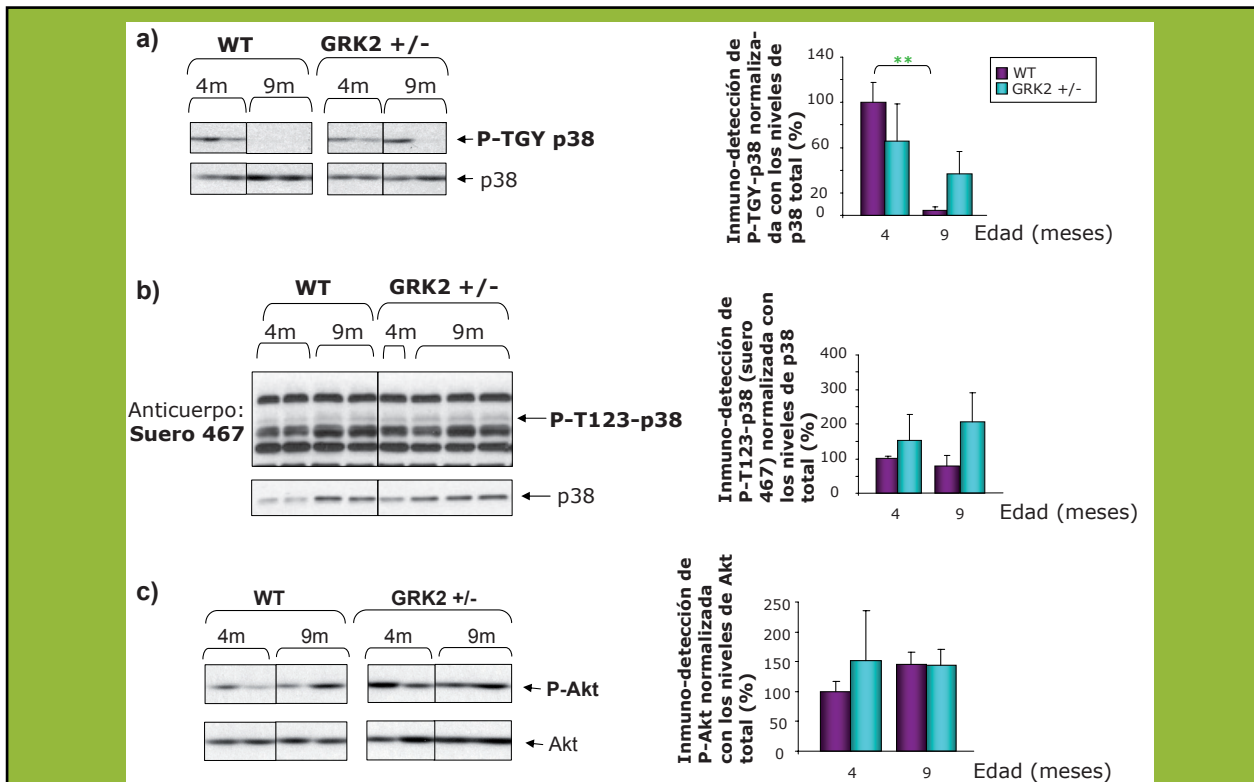


Fig 35. Análisis del estado de activación de p38 y Akt, y detección de P-T123 p38 en tejido cardíaco de ratones GRK2+/+ o GRK2+/- con la edad. **a)** Se extrajo el corazón de ratones GRK2+/+ (WT) y GRK2+/- de 4 y 9 meses de edad. La parte apical se congeló a -70°C y se procesó mediante pulverización en nitrógeno líquido y lisis en tampón hipotónico, como se describe en Materiales y Métodos. Se realizaron experimentos de western-blot para analizar los niveles de p38 totales y p38 activa (P-TGY). La señal detectada normalizada con los niveles totales de p38 se representa en la gráfica, expresada en porcentaje relativo a los animales WT de 4 meses de edad, que se tomaron como 100%. Se analizaron mediante T de Student de dos colas y distinta varianza los resultados de los animales WT con la edad, de los GRK2+/- con la edad, y también se compararon los animales WT y GRK2+/- de cada edad. **p<0,01. **b)** Se analizaron las mismas muestras con fosfo-anticuerpos contra P-T123-p38 a una dilución de 1:1000. Se muestran los resultados obtenidos con el fosfo-anticuerpo 467 relativo a los niveles totales de p38, y no se detectaron diferencias significativas. **c)** Se realizó el mismo tipo de análisis de las figuras 32-34 para estudiar la fosforilación de AKT. Se muestran los niveles corregidos con los niveles totales de esta proteína. Número muestral: 6-9 ratones por condición. Se muestran inmunoblots representativos.

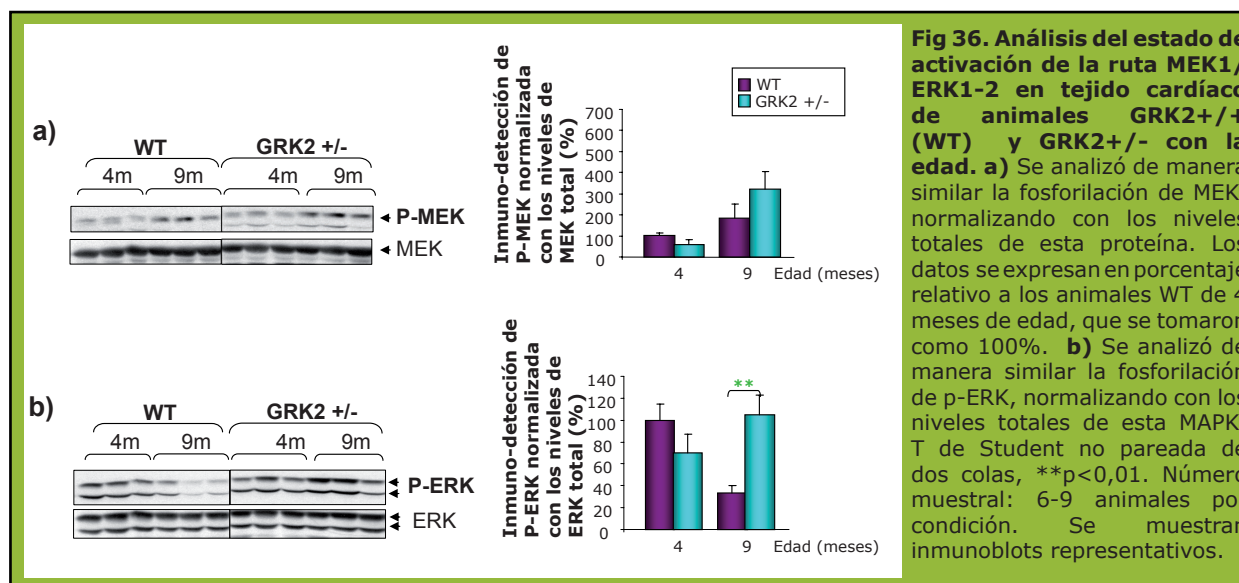


Fig 36. Análisis del estado de activación de la ruta MEK1/ERK1-2 en tejido cardíaco de animales GRK2+/+ (WT) y GRK2+/- con la edad. **a)** Se analizó de manera similar la fosforilación de MEK, normalizando con los niveles totales de esta proteína. Los datos se expresan en porcentaje relativo a los animales WT de 4 meses de edad, que se tomaron como 100%. **b)** Se analizó de manera similar la fosforilación de p-ERK, normalizando con los niveles totales de esta MAPK. T de Student no pareada de dos colas, **p<0,01. Número muestral: 6-9 animales por condición. Se muestran inmunoblots representativos.

los ratones GRK2+/- en el intervalo de los 4 a los 9 meses (figura 36), siendo a los 9 meses de edad significativamente mayores que los niveles detectados en los animales GRK2+/+. Además, es de destacar que también el perfil de activación de ERK es diferente entre los dos grupos de animales con la edad. En ratones GRK2+/+, P-ERK se reduce de los 4 a los 9 meses de edad, intervalo en el que estos animales aún no han desarrollado hipertrofia cardíaca. Sin embargo, en los animales GRK2+/- los niveles de p-ERK se incrementan precisamente durante este periodo en el que detectamos el mayor incremento en crecimiento del corazón en este grupo de animales.

En cuanto a la activación de MEK (figura 36b) se detecta una tendencia a que los niveles de activación de esta quinasa aumenten con la edad, y son algo mayores en los animales GRK2+/- en el intervalo de los 4 a los 9 meses, con respecto a los animales GRK2+/+. Sin embargo, **estas diferencias no son significativas** ni con el envejecimiento ni entre ambos grupos.

Estos datos resultan coherentes con los resultados previos en otros sistemas en los que se observa un papel inhibitorio de la activación de ERK en ausencia de cambios en la fosforilación de MEK (apartado 1.3.)

2.1.5. Estudio de cambios en la expresión génica en ratones GRK2+/+ y GRK2+/- con la edad

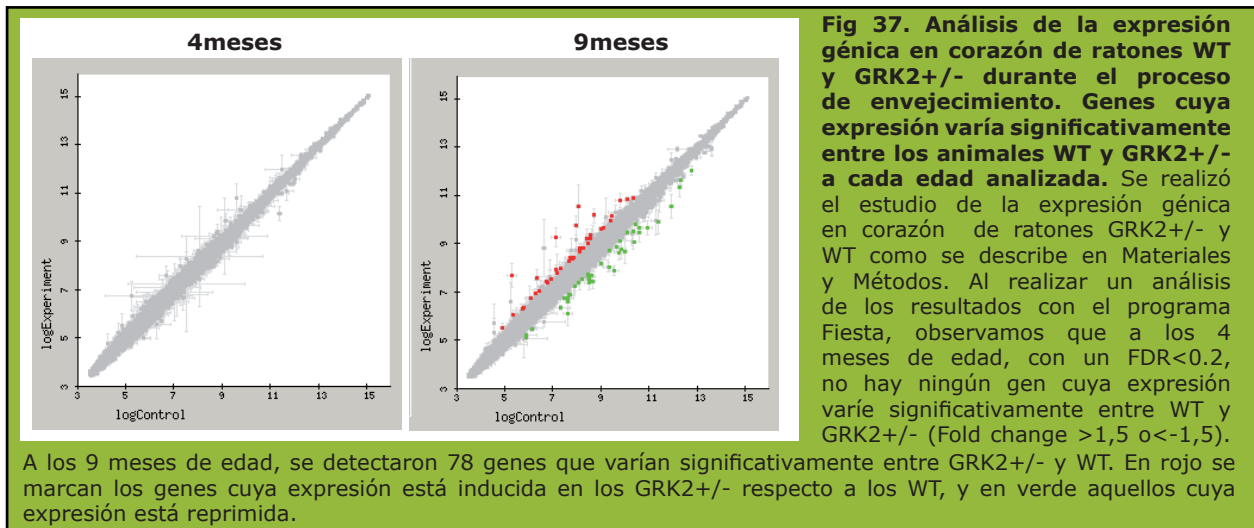
Con la intención de ampliar el estudio acerca de la repercusión de los niveles de

GRK2 en la función cardíaca, llevamos a cabo un análisis de la expresión génica en el corazón de animales silvestres y GRK2+/- con la edad mediante microarrays de alta densidad (chips de Affymetrix Genechip® Mouse Genome 430 2.0, que contienen 39.000 transcritos), como se describe en Materiales y Métodos. Posteriormente realizamos estudios de RT-PCR para validar algunos resultados obtenidos con esta aproximación, y para analizar la expresión de otros genes interesantes para el estudio del desarrollo de hipertrofia cardíaca y del tipo específico de hipertrofia que detectamos.

2.1.5.1. Análisis de los cambios en la expresión génica en corazón de ratones GRK2+/+ y GRK2+/- con la edad

Para estudiar la expresión génica en el corazón de ratones GRK2+/- y silvestres llevamos a cabo experimentos con microarrays de expresión de la plataforma Affymetrix, empleando RNA purificado de corazones de ratones de ambos grupos de hermanos a los 4 y a los 9 meses de edad.

En primer lugar, empleando el visualizador FIESTA y el software Researcher's Digest, desarrollados en el Centro Nacional de Biotecnología (<http://bioinfogp.cnb.csic.es>), analizamos las diferencias de expresión entre animales GRK2+/- y +/+ a cada edad. Realizamos este tipo de análisis con el asesoramiento puntual del Dr. Juan Carlos Oliveros Collazos de la Unidad de Genómica del CNB. Para ello se seleccionaron los genes cuya diferencia de expresión entre ratones GRK2+/- y +/+ obtenía un p-valor



corregido (FDR)<0.2 y una tasa de cambio (fold change) <-1.5 o >1.5. De esta manera observamos que **a los 4 meses de edad no hay ningún gen cuya expresión varíe significativamente entre GRK2+/- y**

+/+, mientras que a los 9 meses de edad se detectaron 78 genes que varían significativamente su expresión entre los dos grupos (figura 37). En la **tabla 1** se detallan aquellos **genes cuya expresión**

FDR	Tasa de cambio	Símbolo Nombre del gen
0,16	+5.68	Egr1 early growth response 1
0,07	+5.40	Egr3 early growth response 3
0,07	+4.49	S100a9 S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)
0,09	+3.59	S100a8 S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
0,09	+2.81	Nr4a1 nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
0,16	+2.41	Cxcl1 chemokine (C-X-C motif) ligand 1
0,14	+1.78	Dixdc1 DIX domain containing 1
0,07	+1.73	Ppargc1b peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta
0,17	+1.70	Thbs1 thrombospondin 1 ///similar to thrombospondin1
0,17	+1.69	Anp32a acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A
0,12	+1.66	Meox2 mesenchyme homeobox 2
0,18	+1.64	Sox4 SRY-box containing gene 4 /// similar to Transcription factor SOX-4
0,14	+1.64	Ada Adenosine deaminase
0,14	+1.61	Aqp7 aquaporin 7
0,14	+1.60	Prox1 prospero-related homeobox 1
0,14	+1.58	Slc2a3 solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
0,14	+1.58	Vegfc vascular endothelial growth factor C
0,16	+1.55	Fosb FBJ osteosarcoma oncogene B
0,07	+1.55	Pde4b phosphodiesterase 4B, cAMP specific

FDR	Tasa de cambio	Símbolo Nombre del gen
0,14	+1.52	Apold1 apolipoprotein L domain containing 1
0,12	+1.52	Rrad Ras-related associated with diabetes
0,19	+1.52	Mmd monocyte to macrophage differentiation-associated
0,12	+1.51	Tcf7l2 transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box
0,14	+1.51	Hdac9 histone deacetylase 9
0,18	+1.51	Bcl2l11 BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
0,17	+1.53	Ehhadh enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase
0,14	-1.51	Cebpd CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta
0,17	-1.51	Tsc22d3 TSC22 domain family 3
0,18	-1.53	Fmo2 flavin containing monooxygenase 2
0,13	-1.54	Mfap5 microfibrillar associated protein 5
0,14	-1.56	Nt5e 5 nucleotidase, ecto
0,19	-1.57	Hspb7 heat shock protein family, member 7 (cardiovascular)
0,18	-1.58	Pik3r1 phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)
0,16	-1.58	Cnksr1 connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1 /// similar to connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1
0,14	-1.6	Pah phenylalanine hydroxylase
0,15	-1.72	Rrm2 ribonucleotide reductase M2
0,11	-1.72	Ibrdc2 IBR domain containing 2
0,12	-1.85	Sult1a1 sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1
0,12	-1.89	Gck glucokinase
0,2	-1.9	Ptgds prostaglandin D2 synthase (brain)
0,2	-1.9	Cyp2b10 cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10
0,14	-2.16	Timp4 tissue inhibitor of metalloproteinase 4
0,15	-2.32	Nppa natriuretic peptide precursor type A
0,09	-2.43	Adh1 alcohol dehydrogenase 1 (class I)
0,18	-2.47	Acta1 actin, alpha 1, skeletal muscle
0,16	-2.66	Zbtb16 zinc finger and BTB domain containing 16

Tabla 1. Genes que muestran una expresión diferencial entre los animales GRK2+/+ y GRK2+/- a los 9 meses de edad. De los 78 genes que varían significativamente, con un FDR<0.2, entre los animales GRK2+/- y los WT a los 9 meses de edad, según el estudio de la expresión génica en corazón con microchips (ver Materiales y Métodos), se muestran aquellos cuya función es conocida. Tasas de cambio positivas indican que la expresión génica está inducida en los animales GRK2+/- con respecto a los WT, y las tasas negativas lo contrario. FDR="False Discovery Rate".

está alterada en los animales GRK2+/- frente a los +/+.

Como se aprecia en la **figura 38**, los genes que destacan por su **inducción** en estos ratones están implicados principalmente en **crecimiento celular** y **contracción muscular**, y parecen estar indicando que a esta edad en el corazón de ratones GRK2+/- están teniendo lugar procesos de crecimiento muscular. Por otro lado, entre los genes cuya expresión está **reprimida** en el corazón de ratones GRK2+/- a los 9 meses de edad destacan genes implicados en **procesos inflamatorios** y en **catabolismo**.

Al analizar estos genes con más detalle, estudiando su función en el tejido cardíaco, observamos que entre los **genes cuya expresión es mayor en los ratones GRK2+/-** frente a los WT a los 9 meses de edad encontramos:

-Egr1 y Egr3: son factores de transcripción que controlan la expresión de un elevado número de genes y promueven la hipertrofia de los cardiomiocitos. No está claro si se

inducen sólo en la hipertrofia patológica o también en la fisiológica (Buitrago et al. 2005); (Swirnoff et al. 1998). La expresión de *Egr1* está regulada a la alta, de manera dependiente de activación de ERK, en situación de estrés hemodinámico, humoral o por estimulación con insulina (Patrizio et al. 2008); (Wang et al. 2006).

-Nr4a1 (Nur77): codifica para un receptor nuclear con un posible papel protector en enfermedades vasculares (Pols et al. 2007). Actúa como un factor de transcripción nuclear, activado por la cascada de ERK MAPK en procesos de crecimiento celular. Se trata de un gen temprano de respuesta a estrés.

-Sox4: codifica para un factor de transcripción embrionario implicado en diferenciación y desarrollo. Promueve el desarrollo del endocardio en la embriogénesis (Schilham et al. 1996).

-Aqp7: gen que codifica para un canal de membrana que facilita el transporte de agua, glicerol y urea. Aquaporina 7 es la única

	FUNCIÓN de las proteínas	Símbolo de los genes
EXPRESIÓN INDUCIDA	Mitogénesis, diferenciación y desarrollo	Egr1, Egr3, Nr4a1, Dixdc1, Meox2, Sox4, Aqp7, Prox1, Fosb, Tcf7l2, Hdac9,
	Adipogénesis y diferenciación	Ppargc1b
	Transportador de glucosa	Slc2a3
	Mitogénesis, diferenciación y procesos inflamatorios	S100a8, S100a9
	Procesos inflamatorios	Cxcl1
	Diferenciación y angiogénesis	Vegfc, Apold1
	Inhibidor de angiogénesis	Thbs1, Anp32a
	Proapoptosis	Bcl2l11
	Catabolismo y contracción muscular	Ada, Pde4b, Ehhadh
	Inhibe hipertrofia cardíaca	Rrad
	Marcador de macrófagos diferenciados	Mmd
EXPRESIÓN REPRIMIDA	Procesos inflamatorios	Timp4, Ptgds, Nt5e, Cebpd
	Efecto anti-inflamatorio e inmunosupresor	Tsc22d3
	Catabolismo no glucídico	Adh1, Cyp2b10, Gck, Sult1a1, Pah, Fmo2
	Anabolismo de nucleótidos	Rrm2
	Inhibidor de apoptosis	Pik3r1
	Pro-apoptosis	Ibrdc2
	Transducción de señales de Ras/Rho	Cnksr1
	Angiogénesis y fibrosis	Mfap5
	Contracción cardíaca	Hspb7
	Vasodilatación	Nppa
	Formación de músculo	Acta1, Zbtb16

Fig 38. Genes que muestran una expresión diferencial entre los ratones GRK2+/+ y GRK2+/- a los 9 meses de edad, agrupados según su función en la célula. Se analizó la función de los genes que se inducen o reprimen en los animales GRK2+/- a los 9 meses, con respecto a los WT, y se agruparon en base al efecto funcional publicado. Fuentes: Entrez Genes/Genes Ontology y Pubmed, entre otras.

aquaporina expresada en corazón, y es el principal canal utilizado para la captación de glicerol. Ratones deficientes en *Aqp7* presentan una peor adaptación miocárdica a la sobrecarga de presión, y como tal desarrollan una excesiva hipertrofia cardíaca que degenera en fallo cardíaco (Hibuse et al. 2009).

-Prox1: necesario en el corazón en desarrollo por regular la transcripción de genes que codifican para proteínas estructurales que permiten la integridad del sarcómero y mantienen la función contráctil (Risebro et al. 2009).

-Hdac9: codifica para un factor de transcripción implicado en procesos inflamatorios y en el desarrollo del corazón. Es un inhibidor de *MEF2*, y experimentalmente se ha comprobado que suprime la hipertrofia patológica, sin afectar al desencadenamiento de hipertrofia fisiológica (Metzger 2002).

-Ppargc1b: es un mediador del anabolismo lipídico, que se encuentra regulado a la alta en situaciones de cardiomiopatía hipertrófica, y parece estar implicado en los cambios en el metabolismo cardíaco que tiene lugar en la transición de hipertrofia a fallo cardíaco (Krishnan et al. 2009).

-Slc2a3 (Glut3): gen que codifica para un transportador de glucosa.

-Calgranulina A y B (S100A8/A9): son proteínas sensoras de calcio implicadas en la regulación de la contractilidad del músculo cardíaco, hipertrofia, apoptosis, regulación de enzimas metabólicas, etc. La integridad del dímero *S100A8/9* es un requerimiento básico para el desarrollo y la función cardiovascular normal, funcionando como proteínas anti-hipertróficas (Kraus et al. 2009).

-Cxcl1: gen que codifica para una quimioquina implicada en el desarrollo, homeostasis y procesos inflamatorios.

-Thbs1: codifica para un inhibidor de la angiogénesis que previene la capilarización excesiva del corazón, lo que tiene un posible papel protector cardiovascular (Malek et al. 2009).

-Ada: gen que codifica para una enzima

que cataliza la hidrólisis de la adenosina. Además, regula positivamente la contracción muscular. La adenosina tiene un efecto anti-hipertrófico en el corazón, y los niveles de adenosina plasmática se elevan en pacientes con fallo cardíaco (Pang et al.).

-Pde4b: codifica para una proteína que hidroliza cAMP, y es crítica para la contracción del músculo. En una situación de hipertrofia cardíaca, la desensibilización β -adrenérgica está acompañada por una reducción de la expresión de fosfodiesterasas de cAMP y por tanto una alterada modulación de la señal cAMP. Así, se ha observado una reducción de *PDE4B* en cardiomiocitos hipertróficos por sobrecarga neurohumoral (Abi-Gerges et al. 2009). Unos niveles elevados de esta enzima pueden tener acción cardio-protectora, al inhibir la señal β -adrenérgica.

-Rrad: gen que codifica para una proteína con actividad GTPasa implicada en el desarrollo de resistencia a insulina (Ilany et al. 2006). Su expresión está disminuida en corazones con fallo cardíaco, y se ha demostrado que inhibe la generación de hipertrofia generada en cardiomiocitos en cultivo por sobrecarga de presión y neurohumoral a través de la vía de la quinasa dependiente de Calcio-calmodulina II (Chang et al. 2007). Además, se ha publicado que, en corazones sanos, la insulina aumenta su expresión (Coletta et al. 2008).

-Mmd: codifica para una proteína que se expresa en macrófagos diferenciados.

Por otro lado, entre los genes cuya expresión es menor en los ratones **GRK2+/-** frente a los WT a los 9 meses de edad encontramos:

-Timp4: codifica para una proteína de la familia *TIMP* de inhibidores de metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular, importantes en el remodelado cardíaco. Se ha descrito sobre-expresión de *TIMP4* en desórdenes cardiovasculares inflamatorios, y se emplea como marcador de inflamación vascular (Koskivirta et al. 2006). Además, la expresión de *Timp4* está aumentada en fallo cardíaco (Felkin et al. 2006).

-Nt5e y Cebpd: están implicados en la respuesta inmune e inflamatoria, y en la

activación de macrófagos.

-Adh1: gen que codifica para una enzima implicada en la degradación de los alcoholes en aldehídos o cetonas.

-Cyp2b10: codifica para una proteína implicada en metabolismo oxidativo mitocondrial.

-Gck: gen que codifica para una enzima implicada en la vía de la glicolisis.

-Pah: codifica para una enzima del catabolismo de la fenilalanina.

-Pik3r1: gen que codifica para la subunidad reguladora de la enzima Fosfatidilinositol-3-quinasa, importante en las acciones metabólicas de la insulina.

-Mfap5: codifica para una glicoproteína que actúa como reguladora de angiogénesis (Albig et al. 2007). También está implicada en el desarrollo de fibrosis (Lemaire et al. 2004).

-Hspb7: codifica para una proteína implicada en la regulación de la contracción cardíaca, cuya expresión está inhibida en un modelo

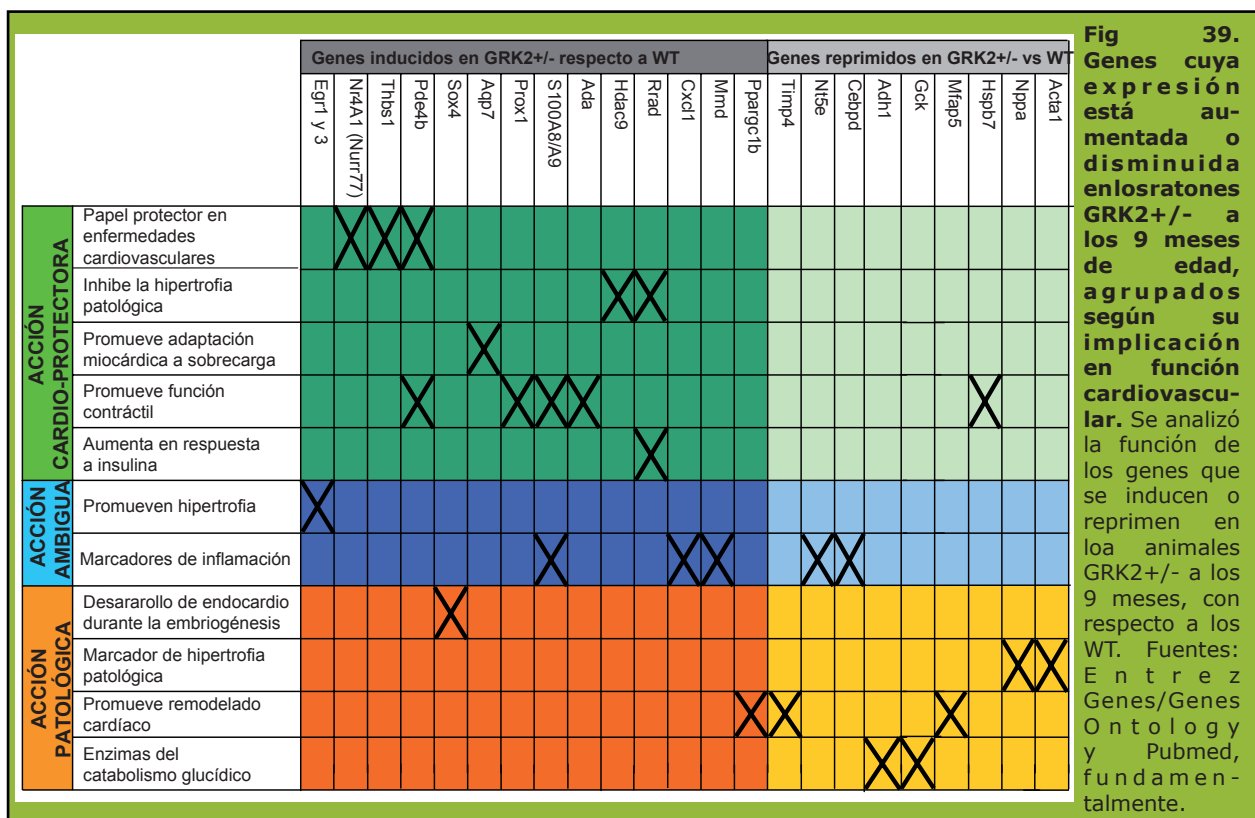
de hipertrofia ventricular generada por constricción aórtica (Krief et al. 1999).

-Nppa: codifica para una proteína que actúa como vasodilatadora, que se encuentra sobre-expresada en situaciones de hipertrofia cardíaca descompensada (con concurso de reprogramación fetal) (Jeong et al. 2005).

-Acta1: codifica para una proteína implicada en la formación y contracción del músculo cardíaco durante el crecimiento fetal y que constituye un biomarcador de hipertrofia de tipo descompensado debido a que forma parte de la reprogramación a genes fetales, como se ha descrito, mientras que es la actina cardíaca sarcomérica la predominante en músculo cardíaco adulto (Jeong et al. 2005).

La relación entre estos genes inducidos o reprimidos y su acción a nivel cardiovascular se resume en la **figura 39**.

En conjunto, estos resultados indican que en el corazón de los ratones GRK2+/- a los 9 meses de edad está **incrementada la expresión**, respecto de los animales WT, de algunas proteínas relacionadas con **acciones cardioprotectoras**, entre las que destacan proteínas que favorecen la función contráctil. Sin embargo está **disminuida la**



expresión de proteínas con implicaciones patológicas, como son el precursor de péptido natriaurético A y la actina 1 de músculo esquelético, ambos marcadores de hipertrofia patológica, así como proteínas que promueven el remodelado cardíaco que tiene lugar en el paso de la hipertrofia fisiológica a una situación anómala.

También **comparamos los patrones de expresión génica entre los ratones GRK2+/- y los +/+ de los 4 a los 9 meses de edad**. En primer lugar, filtramos los genes con patrones planos como se describe en Materiales y Métodos, y eliminamos también del análisis aquellos genes en los que no hay diferencias significativas de expresión entre GRK2+/- y WT a ninguna edad (es decir, aquéllos en los que en ninguna de las edades ocurre que $FDR < 0.2$ y que $Fold\ Change > 1.5$ o > 1.5). Así, analizamos con el software MultiExperiment Viewer 153 genes en los que en alguna de las edades existen diferencias significativas entre WT y GRK2+/- mediante agrupamiento o clustering jerárquico (HCL) o particional (KMC).

Para facilitar el análisis de los resultados realizamos un **agrupamiento particional**, esto es, clasificamos los genes según su patrón de expresión con la edad, y obtuvimos las representaciones que se muestran en la **figura 40a**. Los 153 genes en los que hay cambios significativos de expresión entre los animales GRK2+/- y WT en alguna de las edades analizadas fueron agrupados en 4 grupos:

-Grupo 1: **Genes cuya expresión aumenta en los GRK2+/- frente a los +/+ de los 4 a los 9 meses (figura 40b)**. Son principalmente los genes que hemos descrito como activados en los animales GRK2+/- a los 9 meses. Este tipo de análisis indica que la activación de estos genes ocurre a los 9 meses mientras que a los 4 meses de edad se observan pocas diferencias de expresión entre GRK2+/- y WT, lo que puede relacionar la activación de estos genes con el fenotipo de hipertrofia que hemos detectado en los ratones GRK2+/- . El color rojo indica que la expresión está activada en los animales GRK2+/- frente a los WT, mientras que el verde indica que la expresión está inhibida en los animales GRK2+/- frente a los WT.

-Grupo 2: **Genes cuya expresión**

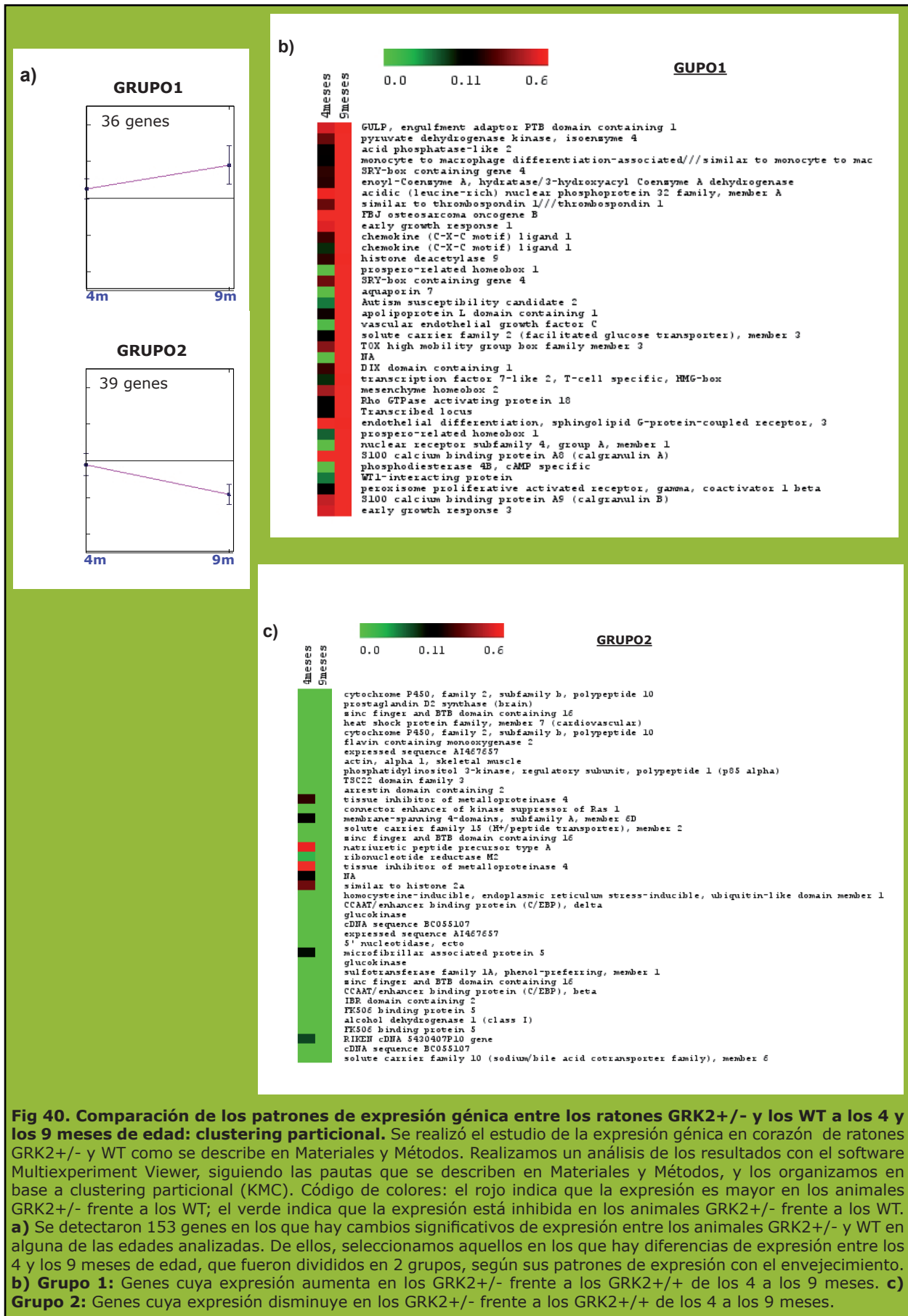
disminuye en los GRK2+/- frente a los +/+ de los 4 a los 9 meses (figura 40c). Son aquellos que hemos descrito como inhibidos en los animales GRK2+/- a los 9 meses de edad, entre los que destacan la actina $\alpha 1$ esquelética y el precursor de péptido natriaurético A que, como se ha descrito, son genes relacionados con el desarrollo de hipertrofia patológica. En muchos casos, la expresión de estos genes aparece ya disminuida en los GRK2+/- a los 4 meses de edad, pero el hecho es que de los 4 a los 9 meses aumenta aun más la diferencia entre GRK2+/- y WT, apuntando de nuevo a la posible relación entre estos genes y el fenotipo de hipertrofia descrito.

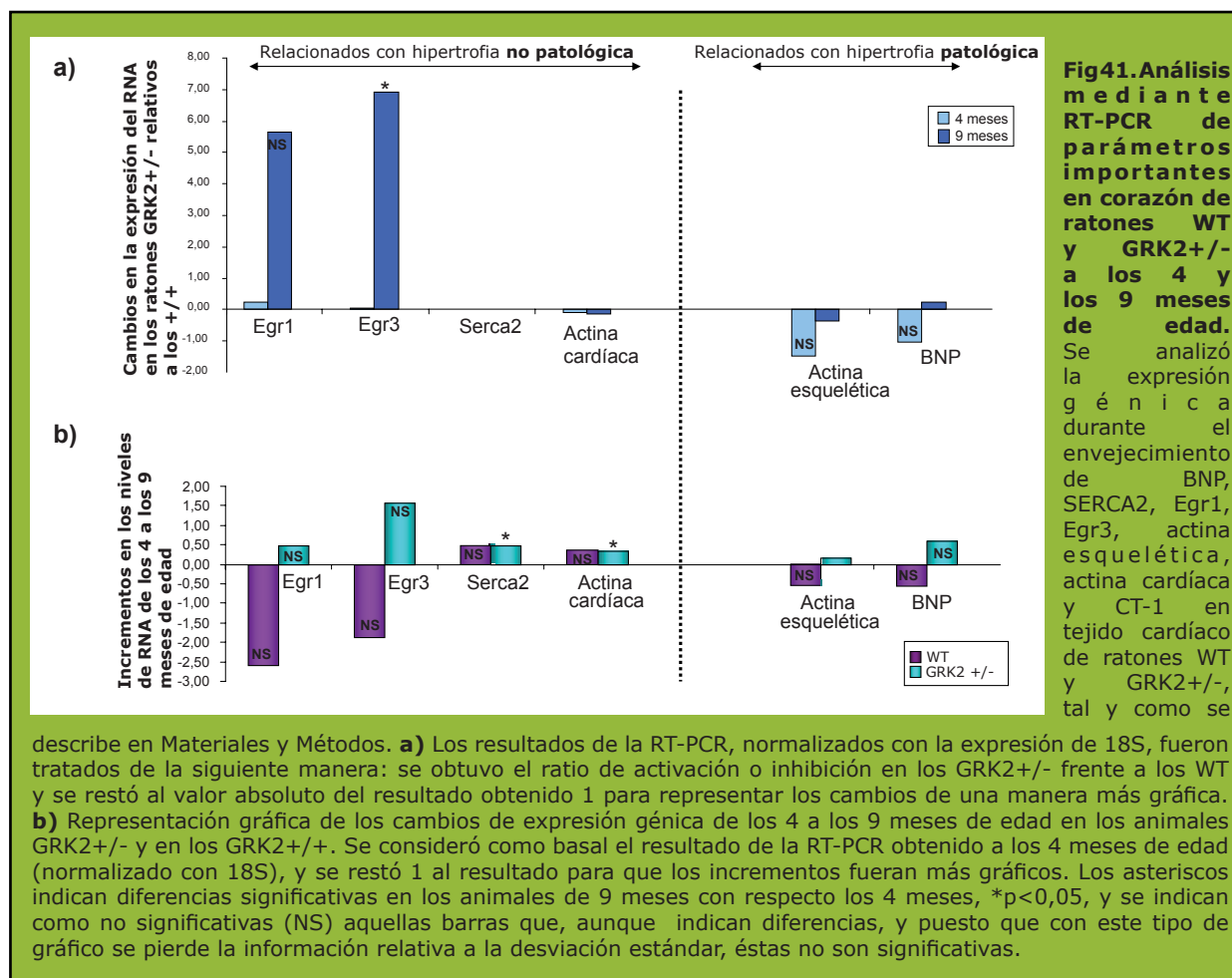
2.1.5.2. Análisis mediante RT-PCR de parámetros importantes en corazón de ratones WT y GRK2+/-

Puesto que la hipertrofia cardíaca compensada se debe a la activación de ciertas rutas intracelulares de señalización entre las que cabe mencionar la activación de JAK/STAT por cardiotrofina/gp130 (Dorn et al. 2005; Barry et al. 2008), quisimos analizar la expresión de cardiotrofina en el corazón de ratones GRK2+/+ y GRK2+/- durante el envejecimiento. También quisimos analizar la expresión de otros marcadores de hipertrofia patológica o compensada, como SERCA2, BNP, actina esquelética del músculo y actina cardíaca. Asimismo quisimos validar los cambios de expresión observados con el microarray de Affymetrix, fundamentalmente en lo que respecta a Egr1 y Egr3 (los que mayor tasa de cambio presentaban en el chip).

En estos experimentos se obtuvo una elevada tasa de variabilidad intrapoblacional, a pesar de lo cual se obtuvieron algunos resultados interesantes. En la **figura 41a** se representa el perfil de activación o inhibición de la expresión génica en los ratones GRK2+/- frente a los WT con la edad. Los niveles de **Egr1 y 3** (implicados en mitogénesis y diferenciación), cuya expresión detectada con el microarray estaba aumentada en los GRK2+/- de 9 meses frente a los WT, se observan también elevados en la RT-PCR, siendo este incremento significativo para Egr3 pero no para Egr1 posiblemente debido a la elevada variabilidad poblacional.

Los cambios en el patrón de expresión génica de los 4 a los 9 meses de edad son más pronunciados en los animales GRK2+/-





(figura 41b) que en los animales WT. En los primeros se detecta un incremento significativo en la expresión de **SERCA2** y **actina cardíaca**, mientras que en los animales silvestres no se detectan cambios significativos. Estos resultados son compatibles con la hipótesis de que la hipertrofia detectada en los animales GRK2+/- de 9 meses de edad es de tipo fisiológico dado que la actina cardíaca indica hipertrofia, y la proteína SERCA2 es un marcador bien establecido de una correcta funcionalidad miocárdica.

La **actina α esquelética**, aumentada en corazón en situación de hipertrofia cardíaca patológica, no se encuentra alterada sustancialmente en la hipertrofia fisiológica. Los datos del microarray indicaban que su expresión está inhibida a los 9 meses en los ratones GRK2+/- frente a los WT. Los resultados de la RT-PCR revelan una tendencia a esta inhibición, aunque no es significativa.

El **BNP**, de igual manera, se encuentra sobre-expresado en el caso de la hipertrofia

patológica y no alterado sustancialmente en la fisiológica. Los datos del microarray no revelaban diferencias de expresión entre los animales GRK2+/- y WT a los 9 meses, y la RT-PCR tampoco las muestra, de nuevo apoyando a nivel molecular que el tipo de hipertrofia que encontramos es compensada.

Por último, analizamos la expresión de **cardiotrofina 1**, pero no está alterada ni durante el envejecimiento ni entre los dos grupos de ratones.

Así, los resultados obtenidos mediante RT-PCR muestran que **la expresión de marcadores de hipertrofia fisiológica, como SERCA2 y actina cardíaca, está aumentada en los corazones de ratones GRK2+/- a los 9 meses** frente a hermanos silvestres. La expresión de otras moléculas que se sobre-expresan en una situación de hipertrofia patológica está sin embargo inhibida en estos corazones. Estos datos, aunque preliminares, apoyan la conclusión de que la hipertrofia cardíaca que está

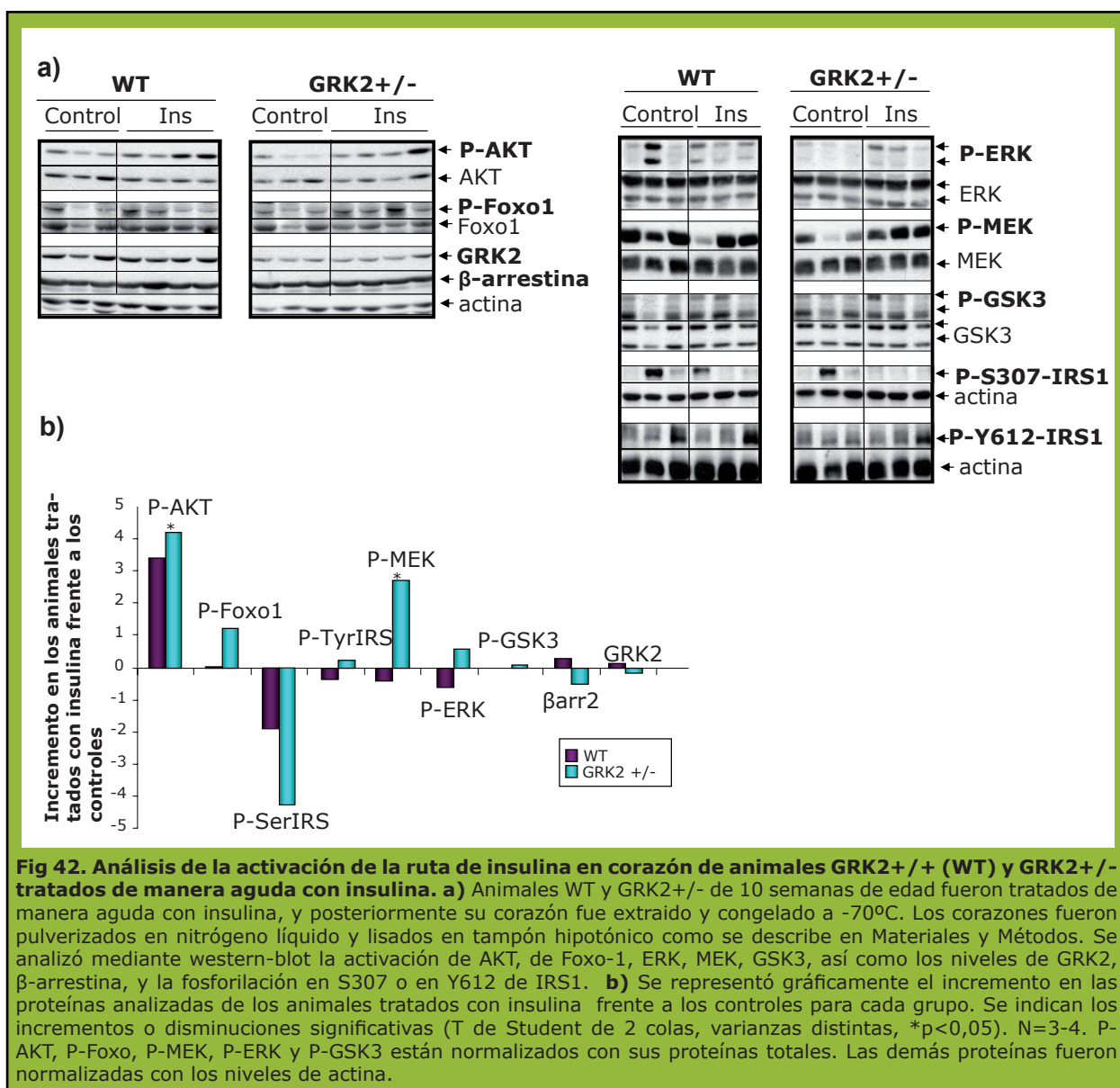
teniendo lugar en los animales GRK2+/- es del tipo fisiológico o compensado.

2.2. Papel de GRK2 en la regulación de la señalización por insulina

Con estos precedentes, nos resultó interesante investigar la posible conexión entre los niveles de GRK2 y los conocidos efectos de la resistencia a insulina, diabetes o síndrome metabólico, y el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda y/o disfunción cardíaca. Está ampliamente demostrado que insulina es una hormona que induce supervivencia del tejido miocárdico (Devereux et al. 2000; Rutter et al. 2003; Kaftan et al. 2006). Además, varios trabajos

han sugerido que existe un papel inhibitorio para GRK2 sobre la señalización por insulina en algunos tipos celulares no cardíacos (Usui et al. 2004). Era factible investigar, por tanto, si una inhibición sistémica de GRK2 podría ayudar a incrementar los efectos citoprotectores (e hipertróficos) de la insulina en miocardio. Ello sería de interés como posible aproximación farmacológica para contrarrestar, al menos en parte, los efectos adversos que, por ejemplo, la resistencia a insulina desarrollada con la edad causa en corazón.

Analizamos así el estado de activación de diferentes proteínas implicadas en la ruta de respuesta a insulina en corazones de animales GRK2+/- o WT jóvenes tratados con insulina. Como se aprecia en la **figura**



42, en los ratones GRK2+/- se activa más la ruta de la insulina que en los WT en respuesta a un tratamiento agudo con insulina, es decir, son más sensibles a la estimulación con insulina. Así, sobre un fondo de cierta variabilidad en cada ratón, se puede apreciar que la fosforilación de AKT y MEK inducida por insulina en corazón aumenta significativamente en los animales GRK2+/- respecto a los silvestres. Además, la fosforilación de otros componentes de estas rutas, como son el factor de transcripción Foxo y ERK y la fosforilación en tirosinas de IRS tienden a aumentar más en los ratones GRK2+/- que en los +/+, mientras que ocurre lo contrario en la fosforilación en serinas de IRS, que tiene un carácter inhibitor.

Dado que la señalización por insulina está incrementada en ratones GRK2 +/- en corazón a nivel bioquímico, quisimos analizar la reacción de estos animales a la inyección de un bolo de glucosa (curva GTT) y a la inyección de insulina (curva

ITT). Lucía García Guerra, del grupo de la Dra. Margarita Lorenzo (Universidad Complutense de Madrid) llevó a cabo estos experimentos en animales de 9 meses de edad en colaboración con nuestro grupo, y observamos que **los ratones GRK2+/- son más tolerantes a glucosa (GTT), y más sensibles a insulina (ITT)** que sus hermanos de camada GRK2+/+ (WT) (**figura 43**).

En línea con estos datos, resultados recientes de nuestra colaboración con el grupo de la Dra. Margarita Lorenzo han permitido detallar que los ratones GRK2+/- tienen incrementadas las respuestas metabólicas y tisulares (tejido adiposo, músculo e hígado) a la insulina, y que, con la edad, estos animales son menos propensos al desarrollo de resistencia a insulina, debido a que a nivel molecular son mucho más sensibles a esta hormona que sus hermanos de camada GRK2+/+. En base a estos resultados, estudiamos si en pacientes con

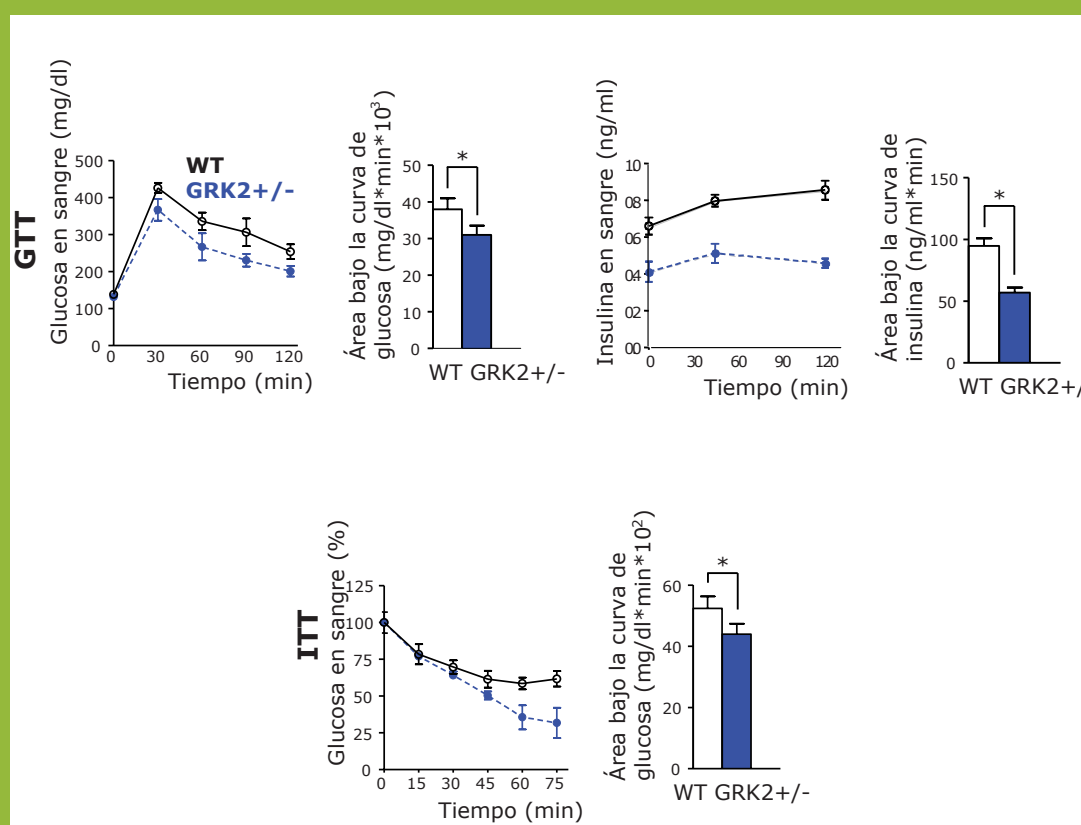
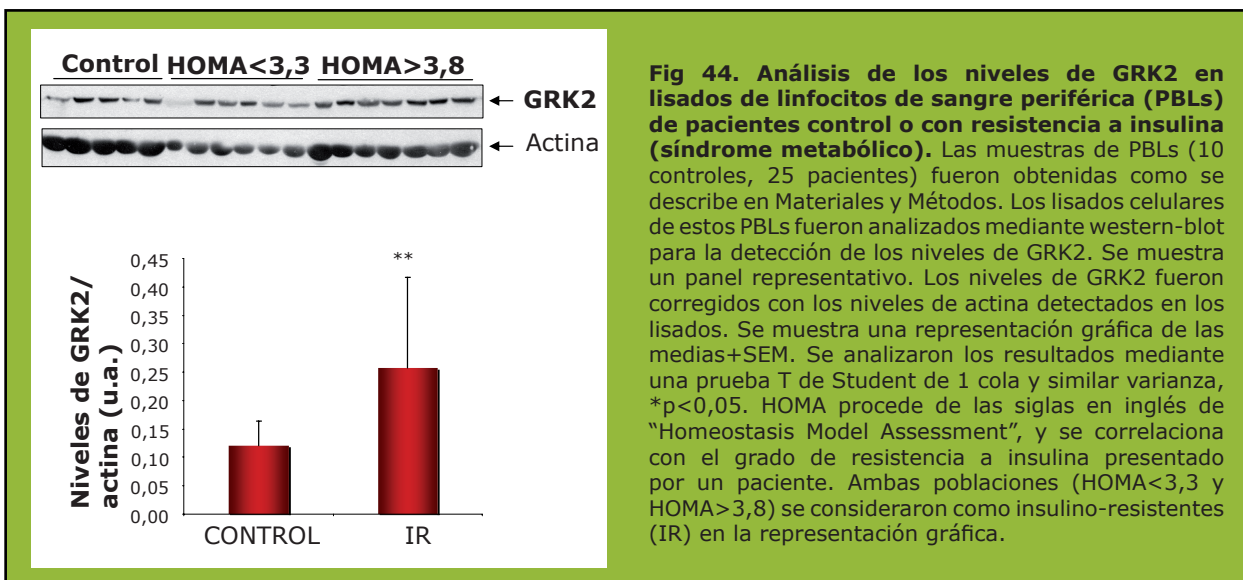


Fig 43. Estudio de la tolerancia a glucosa y a insulina de ratones GRK2+/+ (WT) y GRK2+/- de 9 meses de edad. Test de Tolerancia a glucosa (GTT) y Test de tolerancia a insulina (ITT) realizados como se describe en Materiales y Métodos, en colaboración con el grupo de la Dra. Marga Lorenzo de la U.C.M. WT (círculos blancos y líneas continuas), GRK2+/- (círculos azules y líneas discontinuas). Se muestran también los niveles de insulina circulantes durante el desarrollo de las GTTs. Las barras representan el área bajo la curva correspondiente. *p < 0.01.



síndrome metabólico los niveles de GRK2 se encontraban también alterados, bien como una posible causa o bien como una consecuencia del desarrollo de resistencia a insulina. Para ello, analizamos en una cohorte de pacientes con resistencia a insulina y sus respectivos controles insulina-sensibles, los niveles de GRK2 en linfocitos de sangre periférica (PBLs) en colaboración con el grupo del Dr. Guillermo Zalba, del CIMA en

la Universidad de Navarra.

Como se observa en la **figura 44**, detectamos un **incremento significativo en los niveles de GRK2 en PBLs de pacientes con resistencia a insulina**. Este resultado es coherente con los resultados obtenidos en ratones GRK2+/- y apuntan a que los niveles de GRK2 correlacionan de forma inversa con la sensibilidad tisular y sistémica a insulina en animales y en humanos.

Discusión

Las GRKs están implicadas en otros muchos procesos de señalización celular, además de la desensibilización de la señal de los GPCRs, su función clásica. Dado el papel de estas quinasas en patologías tan importantes como enfermedades cardiovasculares (fallo cardíaco congestivo, hipertrofia ventricular, isquemia miocárdica e hipertensión), enfermedades inflamatorias o progresión tumoral, la comprensión de los fenómenos que subyacen a la compleja regulación de los efectos celulares de estas quinasas, algunos de los cuales se han analizado en este trabajo, resulta fundamental para un mejor entendimiento de estas patologías.

1. INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE GRKs Y MAPK

Dada la relevancia y la versatilidad de las funciones biológicas llevadas a cabo por las MAPK, que pueden regular la transcripción génica y la síntesis proteica, así como la muerte, diferenciación y crecimiento celular, hemos enfocado parte de este trabajo en el estudio de las interacciones funcionales y moleculares entre GRKs y MAPKs.

Las vías de MAPK pueden activarse en respuesta a múltiples estímulos, entre los que se incluye la activación de GPCRs. Por tanto, las GRKs pueden inhibir indirectamente la señalización MAPK al mediar el apagado de estos receptores. Pero, además, existe otro tipo de interacciones entre GRKs y MAPKs. Hemos tratado de profundizar en la comprensión de algunas de ellas.

1.1. GRK5 y ERK

Se ha descrito que GRK5 puede tanto inhibir como facilitar la activación de ERK mediada por β -arrestina, según sea la naturaleza del receptor activado (Kim et al. 2005; Shenoy et al. 2006). Además, GRK5 es capaz de inhibir la fosforilación de ERK1/2 mediada por NF κ B en respuesta a LPS en macrófagos (Parameswaran et al. 2006). Sin embargo hasta ahora no se ha publicado ningún dato acerca de la regulación de funciones de GRK5 por esta MAPK.

Por otro lado, la sobre-expresión de G $\alpha_{12/13}$ desencadena transformación oncogénica, y además sus interacciones biológicas con señales de supervivencia celular como MAPK y proteínas G monoméricas (Ras, Rac y Rho) (Spiegelberg et al. 2007) hacen de G $\alpha_{12/13}$ proteínas muy interesantes en el estudio del cáncer. Además, se ha demostrado su implicación en migración e invasividad (Kelly et al. 2006). En lo que respecta a ERK, se ha descrito tanto una inhibición de esta MAPK por G $\alpha_{12/13}$ (Voyno-Yasenetskaya et al. 1996) como una activación (Mitsui et al. 1997), dependiendo del contexto celular.

Dado que se había descrito que el dominio RH de GRK2 puede interaccionar específicamente con proteínas G $\alpha_{q/11}$ y de este modo controlar ciertas rutas de transducción de señales, nos propusimos investigar si también GRK5, y, en particular, su dominio RH, mantiene algún tipo de interacción funcional con proteínas G.

Hemos podido demostrar que en células HEK293, G $\alpha_{12/13}$ está interaccionando con el dominio RH de la proteína GRK5, y que la interacción de éste con G α_{12} WT es más estable que con el mutante constitutivamente activo G α_{12} QL. Dado que en nuestro laboratorio habíamos observado que GRK5 se fosforila en este dominio RH por ERK, analizamos si un mutante fosfo-mimético de GRK5 en S114 afectaba a esta interacción. A pesar de la variabilidad entre distintos experimentos, detectamos que la unión al mutante activo de G α_{12} parece ser considerablemente superior con la construcción de GRK5 que imita el estado fosforilado por ERK. Esta tendencia no se observa con G α_{12} inactiva, lo que parece indicar que esta fosforilación **aumenta la afinidad de GRK5 por G α_{12} activa**, sin afectar sustancialmente a su afinidad por G α_{12} inactiva.

Dado que tanto GRK5 completa como su dominio RH están interaccionando de manera más estable con las proteínas G $\alpha_{12/13}$ inactivas que activas, puede postularse que esta interacción esté sucediendo de manera constitutiva en un estado basal. En ese caso, es posible especular que un **estímulo que desencadene la activación de la proteína G podría promover la separación entre GRK5 y G α_{12}** , disponiéndolas para interaccionar con otras proteínas y de este modo ejercer sus respectivas funciones

biológicas. Para el caso de $G_{12/13}$, hemos demostrado que un **incremento en los niveles de GRK5 puede reducir la eficacia biológica de procesos** mediados por esta proteína, como la inducción de genes controlados por el SRE y la formación de fibras de estrés en presencia de LPA en células Cos7. Es también posible que la interacción con $G_{12/13}$ sea un mecanismo de control de la actividad de GRK5 en estado basal, por el que en determinadas circunstancias se impida su acción sobre sustratos específicos. Sin embargo, esta última posibilidad no ha sido estudiada todavía.

Con estos resultados, en la **figura D-1** se propone un **modelo** en el que GRK5 se encontraría interaccionando con G_{12} en estado basal. La activación de la proteína G por receptores promovería su disociación de GRK5, lo que permitiría a G_{12} activa llevar a cabo sus funciones biológicas, y además liberaría a GRK5, que podría actuar sobre determinados sustratos o incluso translocarse al núcleo (Johnson et al. 2004). En contextos celulares que promuevan la fosforilación de GRK5 por ERK, se favorecería que GRK5 y G_{12} activa se asociaran, con las correspondientes consecuencias en las funciones celulares de ambas.

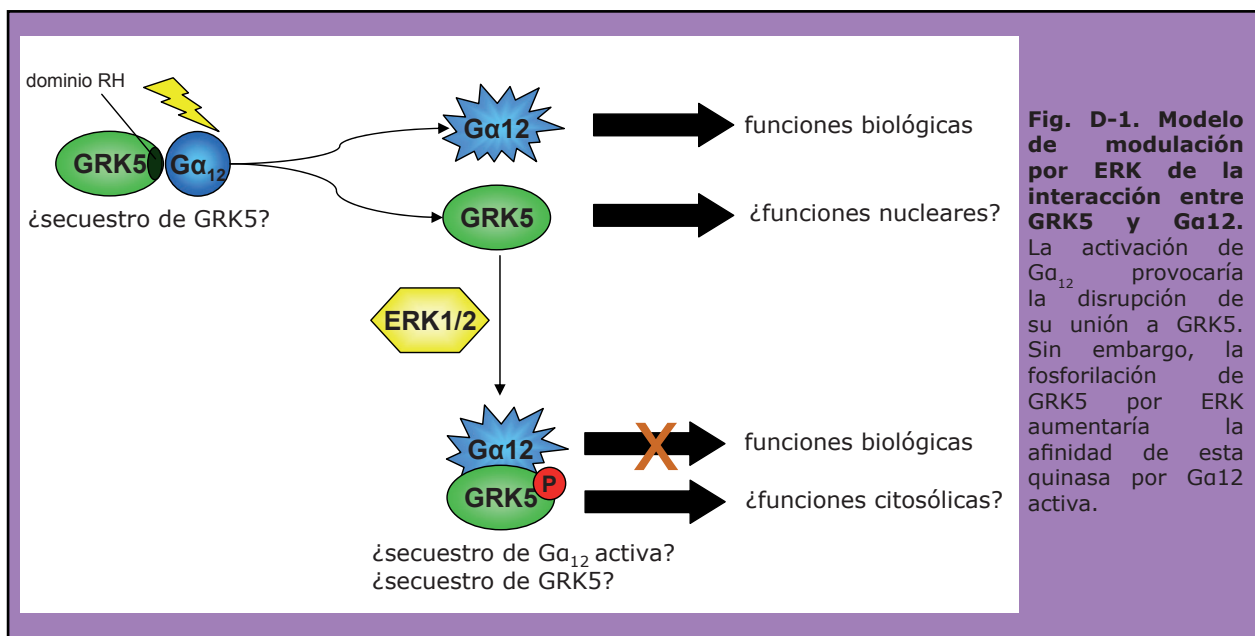
La interacción entre GRK5 y $G_{12/13}$ implica un mecanismo de regulación de las funciones de esta GTPasa, revelándose GRK5 como una nueva proteína accesoria de G_{12} . Queda por explorar la influencia de

esta interacción sobre **funciones mediadas por GRK5**, si resulta inhibitoria o tal vez dirige a esta GRK hacia determinadas dianas celulares. Otra incógnita aun no resuelta es en qué **situaciones *in vivo*** tiene lugar la interacción entre GRK5 y $G_{12/13}$, así como la fosforilación de GRK5 por ERK.

Dado que $G_{12/13}$ está implicada en procesos como el desarrollo embrionario, crecimiento celular, migración, quimiotaxis, apoptosis, contracción muscular y crecimiento neuronal, y que esta vía está alterada en enfermedades como la leucemia, cáncer, hipertensión arterial e hipertrofia cardíaca (Suzuki et al. 2009), sería interesante explorar el efecto de la interacción entre GRK5 y $G_{12/13}$ así como su regulación por ERK en alguna de estas circunstancias.

En este sentido, y dada la importancia de G_{12} en la generación de **tumores**, una búsqueda en la base de datos Oncomine ha revelado que en determinados tumores, principalmente cánceres cerebrales, hepáticos y leucemias, la expresión de GRK5 está disminuida (datos no mostrados).

Por último, no se puede descartar que esta modulación esté implicada en la regulación de **otras funciones de G_{12}** , como su interacción con PP2A y la estimulación de la desfosforilación de algunas dianas como tau (Zhu et al. 2004), o la fosforilación de STAT3 para promover transformación neoplásica (Kumar et al. 2006).



1.2. GRK2 y p38

GRK2 es capaz de inhibir la cascada MAPK a varios niveles (**figura D-2**). Además de mediar la desensibilización e internalización de los GPCRs, e interferir con las funciones de las subunidades de las proteínas G_{α} heterotriméricas, **GRK2 puede fosforilar a p38** en la entrada del surco de anclaje, común para sustratos y activadores, por lo que **impediría tanto su activación como su actividad** (Peregrin et al. 2006).

1.2.1. Secreción de citoquinas inflamatorias

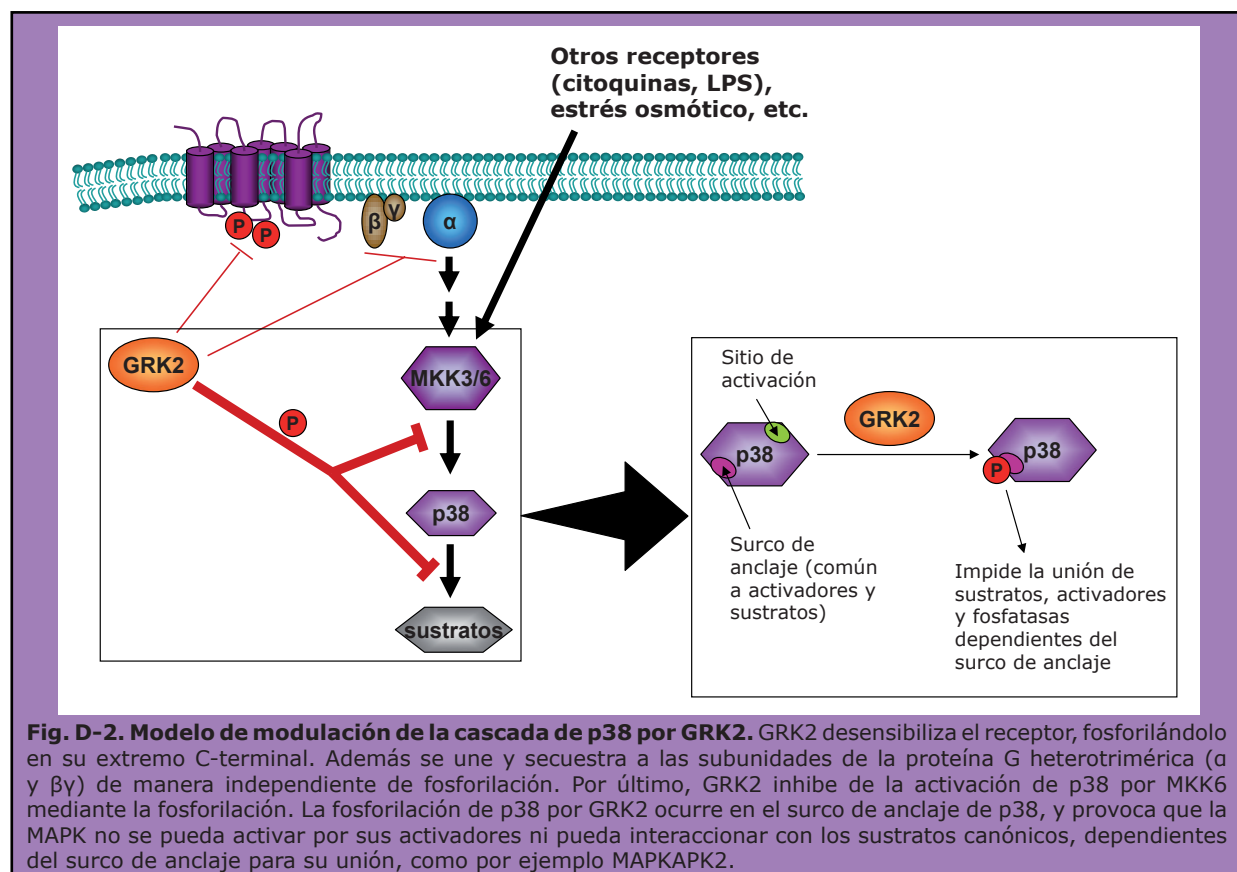
La mayor activación de p38 que describimos en ratones GRK2+/-, con una mayor producción de citoquinas inflamatorias (TNF α) en macrófagos peritoneales (que constituyen la primera barrera de defensa en la cavidad peritoneal y son los responsables de reclutar a otras células inmunes a la zona) en respuesta a LPS, sugieren que diferentes **procesos celulares relacionados con inflamación** estarían aumentados en células procedentes de ratones con menores niveles de GRK2.

Las **patologías inflamatorias** son muy prevalentes y debilitantes, y resulta

clave desarrollar racionalmente fármacos anti-inflamatorios cada vez más específicas para evitar al máximo efectos colaterales. Para lograr esta meta es imprescindible entender bien los procesos de señalización que subyacen los fenómenos inflamatorios (Karin 2005). La fosforilación de p38 por GRK2 podría estar implicada en este tipo de procesos, puesto que los niveles de GRK2 están disminuidos en varias patologías inmunes en los que se observa que p38 está activada, como es la artritis reumatoide en humanos, un modelo de artritis inducida por adyuvante en rata (Lombardi et al. 1999; Lombardi et al. 2001) y en modelos murinos de esclerosis múltiple (Vroon et al. 2005).

En consonancia con nuestros resultados, datos recientes publicados por el laboratorio de la Dra. Heijnen, indican que la disminución de GRK2 en microglía y macrófagos **acelera el daño cerebral causado por hipoxia/isquemia**, en paralelo con una mejor activación de p38 y una mayor producción de TNF α (Nijboer et al. 2009).

La modulación que aquí se describe puede tener relación, además, con la comprobada comunicación que existe entre **el sistema nervioso y el sistema inmune**. GRK2



inhibe la alodinia mecánica y la hiperalgesia termal en un modelo animal de inflamación, mientras que en situación basal, cambios en los niveles de GRK2 no parecen afectar a la percepción del dolor (Kleibeuker et al. 2007). Puesto que tanto ERK como p38 contribuyen a la sensibilización al dolor tras lesión tisular o nerviosa a través de la síntesis de mediadores proinflamatorios y pronociceptivos que incrementan y prolongan el dolor, y que la inhibición de estas vías atenúa el dolor inflamatorio y neuropático en varios modelos animales (Ji et al. 2009), es posible que la inhibición de rutas de ERK y p38 MAPK por GRK2 explique al menos parcialmente el efecto inhibitorio de GRK2 sobre el dolor generado por inflamación.

En este contexto, puesto que la respuesta inflamatoria puede relacionarse con **procesos tumorales**, como es el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal, una de cuyas complicaciones es el riesgo aumentado de desarrollar cáncer de colon (Santiago et al. 2007), sería interesante analizar si los ratones GRK2+/- son más propensos a desarrollar ciertos tipos de cáncer cuya incidencia esté favorecida por la presencia de inflamación. Asimismo, sería atractivo estudiar la respuesta inmune frente a tumores en estos ratones, en los que la migración de las células inmunes está incrementada (Vroon et al. 2006).

Finalmente, considerando que varios compuestos que inhiben a p38 han entrado en estudios clínicos para el tratamiento de la artritis reumatoide y psoriasis, pero no han progresado a fase III debido a su toxicidad (Cohen 2009), es atractivo especular que el mecanismo de inhibición de p38 por GRK2 podría aportar nuevas estrategias para el desarrollo de fármacos más específicos de esta MAPK, con el fin de disminuir los efectos secundarios no deseados.

1.2.2. Diferenciación

También hemos mostrado la implicación de esta modulación inhibitoria de p38 por GRK2 en otro proceso dependiente de p38, como es la **diferenciación de adipocitos**, en la que se da un incremento en los niveles de p38 fosforilada en T123 (inactiva) a lo largo del proceso, que se correlaciona con la disminución en los niveles de p38 endógena activada (Pp38TGY). Puede suponerse que, durante el proceso de diferenciación, desde

el día 1 hasta el 7, GRK2 fosforilaría a p38 paulatinamente incrementando la población de p38 P-T123, y disminuyendo paralelamente los niveles de p38 activada por MKK6 (p38 P-TGY). En consonancia, niveles elevados de p38 fosforilada por GRK2 desde el comienzo del proceso de diferenciación deberían disminuir el porcentaje de células diferenciadas. En efecto, esto es lo que se observa en poblaciones establemente transfectadas con GRK2 (Peregrin et al. 2006). Por el contrario, pre-adipocitos que expresan establemente el mutante inactivo GRK2 K220R muestran más células diferenciadas, llegando incluso a observarse diferenciación espontánea en ausencia de insulina. En esta línea, en esta tesis hemos mostrado que el porcentaje de células que se diferencia es menor cuando se transfecta el mutante p38 T123D, que imita la fosforilación por GRK2, que cuando se sobre-expresa p38 silvestre.

Sería interesante explorar, en modelos *in vivo* como los ratones GRK2+/-, la influencia de GRK2 sobre procesos en los que estén implicadas células cuya diferenciación está controlada por p38MAPK, tales como el proceso de génesis de tejido adiposo (adipocitos), la formación de tejido muscular (mioblastos), la remodelación ósea (osteoclastos), la formación del epitelio intestinal o la maduración de timocitos (Cuenda et al. 2007).

En este sentido, datos recientes obtenidos en colaboración con el grupo de la Dra. Margarita Lorenzo (Universidad Complutense de Madrid) indican una clara correlación entre los niveles de GRK2 y la fosforilación de p38 en T123 en una línea celular de **mioblastos**, aunque el significado de esta fosforilación aún tiene que ser estudiado.

1.2.3. Otros contextos fisio-patológicos

En esta tesis, hemos desarrollado nuevos fosfo-anticuerpos con el objetivo de mejorar la detección de esta fosforilación, determinar otros procesos en los que podría estar implicada y tratar de comprender el mecanismo molecular que desencadena esta modulación. Sin embargo, aunque parece detectarse en diversos tipos celulares, no hemos conseguido definir con precisión, a pesar de nuestros esfuerzos en células de muy diversos orígenes y modelos experimentales diversos, los estímulos que promueven esta fosforilación, ni el contexto fisiológico más favorable para la misma.

El hecho de que los efectos de la activación GPCR sobre la asociación entre p38 y GRK2 no sean pronunciados y varíen con el tipo celular, que no se detecten cambios significativos en los niveles de P-T123 p38 en varios tipos celulares con diversos estímulos que activan o regulan la actividad y/o la localización subcelular de GRK2, y que, en general, un aumento en los niveles de GRK2 no sea suficiente para desencadenar esta fosforilación, revela que este mecanismo regulador probablemente esté ocurriendo en **contextos celulares muy específicos**. El hecho de que los niveles de p38 fosforilada en T123 sean diferentes en distintos tipos celulares a nivel basal puede estar indicando quizá la existencia de una **fosforilación basal** constitutiva diferencial de p38 por GRK2 en determinados contextos. En este sentido, es de destacar que hemos detectado niveles moderadamente elevados de P-T123 p38 en líneas de carcinoma de pulmón y leucemias frente a líneas procedentes de tumores del sistema nervioso o de carcinoma cervical, lo que puede indicar también diferencias a nivel basal en los mecanismos de freno de la actividad de esta MAPK en otros sistemas. La actividad de fosfatasa podría también contribuir al mantenimiento de los niveles basales de p-T123-p38. Los eventos que median la desfosforilación de este residuo, que permitiría la actividad y activación de p38, son objeto de estudio actualmente en nuestro laboratorio.

Se ha descrito que en células en condiciones basales, no estresadas, p38 con bajos niveles de activación puede estar llevando a cabo **funciones "domésticas"**, distintas de las realizadas bajo estrés (Mace et al. 2005). En este sentido es interesante discutir que la fosforilación basal de p38 por GRK2 en T123 aquí descrita podría regulando estas funciones "domésticas" de p38. En condiciones fisiológicas, GRK2 podría ayudar a mantener reducidos los niveles de p38 activa cuando no se dan condiciones celulares adversas como estrés patológico, químico o físico. También es posible que GRK2 regule la activación de p38 **subsecuente a estímulos que potencian la actividad de GRK2**, de manera que una estimulación previa de GRK2 pudiera llevar a una población aumentada de P-T123 p38 y por tanto servir para disminuir la estimulación de p38 por otros agentes

únicamente en contextos en los que GRK2 hubiera sido previamente activada.

A este respecto, al analizar el efecto de varios estímulos en la línea de cardiomiocitos H9c2 sobre la fosforilación de p38 en T123, detectamos esta fosforilación tras estimulación β -adrenérgica a tiempos largos. La activación crónica de GPCRs en el corazón, como los receptores β -adrenérgicos, media la activación sostenida de p38 que agudiza el daño por infiltrados inflamatorios y apoptosis. El incremento de GRK2 en las patologías cardíacas no está claro si es un mecanismo protector o causal, como se discutirá más adelante. Sin embargo, podríamos hipotetizar que el aumento en los niveles de GRK2 (que correlacionan inversamente en estadios finales de la **patología cardíaca**) es un mecanismo compensatorio por el que la célula consigue apagar la activación crónica de p38, asociada a fenómenos de apoptosis, mientras que activaciones transitorias de esta vía se asocian más con fenómenos de supervivencia. Así, es posible que GRK2 sólo fosforile a p38 en el corazón tras estímulos crónicos, lo que explicaría por qué en situación basal no se detectan mayores niveles de p38 fosforilada por GRK2 en los ratones silvestres con respecto a los animales GRK2+/-.

Es interesante que, en nuestros datos preliminares, detectamos mayores niveles de fosforilación de p38 en T123 en **tumores p53 negativos** y en general de menor grado tumoral. Por otro lado, detectamos una mayor fosforilación en líneas celulares no transformadas de tejido mamario frente a líneas transformadas. De confirmarse estos resultados en una población más amplia, sería interesante estudiar en mayor profundidad los mecanismos moleculares que expliquen estas correlaciones, y las posibles implicaciones en las funciones de p38 relacionadas con la apoptosis, la progresión tumoral o el desarrollo de resistencia a agentes quimioterápicos.

Curiosamente, en las muestras de tumores de mama en las que detectamos fosforilación de p38 en T123 se encontraron también mayores niveles de GRK2 fosforilada en S670. Así, una hipótesis plausible es que esta fosforilación de GRK2, que impide su unión al dímero $\beta\gamma$, y, por tanto, reduce su translocación a la membrana, podría dirigir

a GRK2 a otra localización donde podría fosforilar a p38. En este sentido, datos preliminares indican que la fosforilación de p38 por GRK2 varía durante el **ciclo celular**, proceso en el que también se encuentran cambios marcados en los niveles de pS670-GRK2 (Penela et al. 2010). Aunque no sabemos si estas variaciones correlacionan con los cambios en la fosforilación de GRK2 en S670 durante el ciclo, es posible que la fosforilación de p38 en T123 tenga alguna función dependiente de la fase de ciclo celular, o incluso en su control, ya que p38 participa de manera clave en la regulación del mismo.

En relación con esto, dada la importancia de la **localización subcelular** de las MAPK en su regulación, otra posibilidad es que la fosforilación de p38 por GRK2 esté ocurriendo en alguna localización subcelular específica. Datos preliminares utilizando los fosfoanticuerpos anti-PT123 p38 en inmunofluorescencia muestran señal en los centrosomas y, si bien esto puede deberse a fenómenos de posible señal inespecífica de los anticuerpos en esta técnica (potenciados por la abundancia antigénica en estas estructuras celulares), el hecho de que GIT1 (proteína que interacciona con GRKs) (Zhao et al. 2005), p38 y P-Ser33 p53 (Mikule et al. 2007) se localicen en centrosomas, permite especular que tal vez la fosforilación inhibitoria de p38 por GRK2 podría ocurrir de manera preferente en compartimentos subcelulares tan localmente restringidos como éste.

1.3. GRK2 y ERK

GRK2 es capaz de inhibir la activación de ERK1/2 por GPCR mediante la desensibilización e internalización del receptor, e interaccionando con las subunidades de las proteínas G. Es interesante destacar que en determinadas circunstancias GRK2 puede modular positivamente la vía ERK en respuesta a adhesión y S1P a través de su interacción con GIT1 (Penela et al. 2008) o promover la activación de ERK inducida por EGF en células HEK293 (Gao et al. 2005), o por el contrario **inhibir** la activación de la ruta de ERK en respuesta a quimioquinas en estas células, en esplenocitos y en astrocitos, **sin afectar a la activación de MEK** y de manera **independiente de su actividad quinasa** y del desacoplamiento de $G\alpha$ (Jimenez-Sainz et

al. 2006) (**figura D-3**). Dada la importancia de esta MAPK en la fisiología de la célula, es razonable que se encuentre regulada a muy diversos niveles, y de una manera específica en cada tipo celular. Además ERK está implicado en procesos de retroalimentación de la señalización hacia las vías de GPCRs, hacia las GRKs, β -arrestinas, Fosfolipasa A2, proteínas de andamiaje, fosfodiesterasas y proteínas del citoesqueleto. Esos bucles de retroalimentación son responsables de que ERK controle su propia maquinaria reguladora, entre la que se encuentra GRK2, que al ser fosforilada por ERK tras estimulación de GPCRs deja de interaccionar con $\beta\gamma$, y se degrada por el proteasoma (Elorza et al. 2003).

En esta tesis, identificamos una nueva vía de inhibición de la activación de ERK por GRK2 a nivel de la interfase MEK/ERK.

Al analizar el **mecanismo molecular** de esta modulación, GIT parecía un buen candidato para mediar la regulación negativa de GRK2 sobre ERK ya que interacciona con GRK2 y con MEK. GRK2 se une a GIT1 y facilita su translocación a membrana (Premont et al. 1998). Además, GIT1 es una proteína puente que facilita la activación dependiente de c-Src de MEK1-ERK1/2 en respuesta a GPCRs y TKRs (Yin et al. 2004). Sin embargo, nuestros resultados indican que GIT no parece mediar esta interacción, al menos en células HEK293, ya que ciertos mutantes de GRK2 con baja interacción con GIT1 (S670D) (Penela et al. 2008) también co-inmunoprecipitan con MEK de una manera similar a la que lo hace GRK2 silvestre, y que un incremento de GIT1, mediante contrasfección, no parece incrementar ni reducir la cantidad de MEK detectada en los complejos con GRK2. Por otra parte, mediante experimentos *in vitro* con proteínas purificadas, se ha comprobado que GRK2 interacciona con MEK de manera directa. El hecho de que la fosforilación de ERK por MEK *in vitro* no se vea afectada por la presencia de GRK2, apoya la hipótesis de que este tipo de inhibición **depende del contexto celular en donde se encuentren acoplados GRK2 y MEK**. Hemos observado que GRK2 y MEK endógenas están en el mismo complejo molecular en las células en cultivo de manera "basal" (i.e., en presencia de suero), en tipos celulares con distintos niveles endógenos de GRK2 y MEK, si bien también describimos que GRK2 interacciona de manera más estable

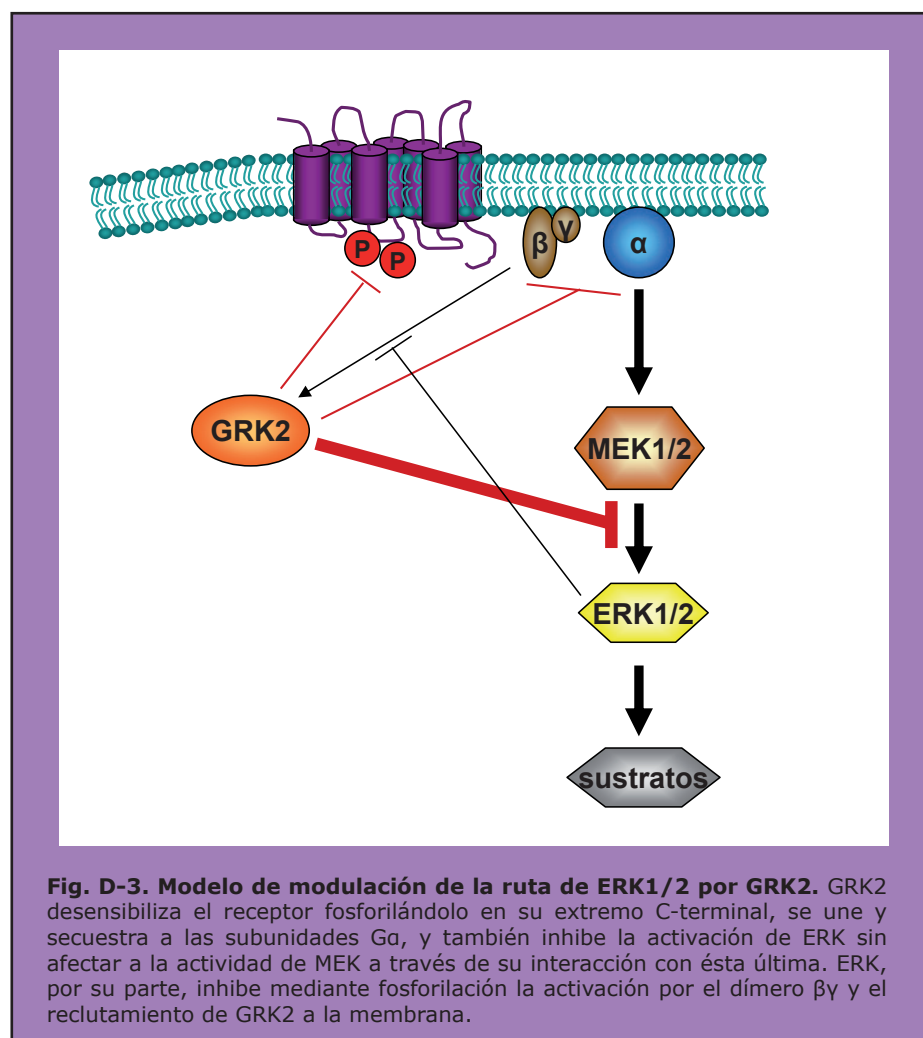
con MEK activa.

En este contexto, cobra protagonismo la proteína dinamina, que cataliza la fisión de vesículas recubiertas de clatrina de la membrana plasmática (Benard et al. 2001). El mutante dominante negativo de dinamina (dinamina K44A) inhibe la activación de ERK pero no de MEK en respuesta a LPA o CCR2B (Kranenburg et al. 1999), de forma similar a lo que hemos observado con GRK2. Este mutante de dinamina impide la internalización de vesículas dependiente de clatrina, necesaria para la activación de ERK por MEK en estas condiciones. Además, MEK activa se encuentra en membrana y en vesículas intracelulares, pero no en el citosol (Werry et al. 2005). Los datos de

sea **específica de los complejos MEK-ERK en esta localización subcelular**, donde también se encuentra GRK2 tras la estimulación de GPCRs. Esto aportaría un nuevo nivel de bloqueo de señales por GRK2 específico para la población de ERK situada en este compartimento subcelular, aunque esta hipótesis de trabajo requiere de un estudio mucho más extenso para su validación.

El nuevo mecanismo de regulación que describimos podría tener consecuencias fisiológicas importantes, puesto que implica que los cambios en la expresión de GRK2 pueden producir alteraciones en la señalización independientemente del receptor. Así, en

células astrocíticas la estimulación con IL1 β promueve un incremento en la expresión de GRK2 y una activación impedida de ERK en respuesta a una posterior activación con citoquinas (Kleibeuker et al. 2008). Por otra parte, es clara la importancia de las GRKs en células inmunes, que expresan GPCRs para quimioquinas, neuropéptidos y neurotransmisores, entre otros ligandos (Lombardietal.2002), y la disminución experimental de GRK2 (similar a la que ocurre en procesos inflamatorios) altera las señales de estos mensajeros a la vía ERK (Vroon et al. 2004), sin alterar la estimulación de MEK (Jimenez-Sainz et al. 2006)



la Dra. Anna Aragay que muestran que una construcción de GRK2 sin la región de unión a clatrina (que no se localizaría en vesículas) no inhibe la activación de ERK por MEK, apuntan a la posibilidad de que la inhibición de la activación de ERK por MEK

en linfocitos. Lo mismo sucede en el **corazón** de ratones GRK2+/-, donde se detecta una mayor activación de ERK que en animales WT, sin afectarse la activación de MEK significativamente, cuyas posibles consecuencias discutimos más adelante.

2. IMPACTO *IN VIVO* DE CAMBIOS EN LOS NIVELES DE GRK2

Los ratones GRK2+/- , que presentan una reducción de aproximadamente el 50% en los niveles de GRK2, constituyen un excelente modelo para explorar el impacto *in situ* de cambios moderados, de rango fisiológico, en los niveles de esta quinasa, tanto en la modulación de las rutas p38 y ERK1/2 en distintos tipos celulares descrita en apartados previos, como en los procesos fisio-patológicos en los que las alteraciones en los niveles de GRK2 son importantes, como es el caso de diversas patologías cardíacas. En este sentido, en esta tesis se han analizado en detalle los cambios que tienen lugar en el corazón de estos animales con la edad, con el objetivo de esclarecer las posibles repercusiones de una inhibición sostenida de GRK2 a nivel sistémico, equiparable a la que podría darse tras una utilización clínica sostenida de inhibidores de GRK2.

2.1. Influencia de los niveles de GRK2 en la reprogramación génica cardíaca

Es destacable que, al analizar los patrones de expresión génica en el corazón de los ratones GRK2+/- , en comparación con sus hermanos de camada WT, se ha detectado una inducción de genes regulados por vías que pueden ser inhibidas por GRK2. Así, entre los **genes inducidos en el corazón de animales GRK2+/-** destacan algunos cuya expresión está favorecida por ERK (**figura D-4**) o por la vía de insulina. Entre ellos, *Egr3*, gen que promueve hipertrofia y cuya expresión está regulada a la alta, de manera dependiente de activación de ERK, en situación de estrés hemodinámico, humoral o por estimulación con insulina (Wang et al. 2006; Patrizio et al. 2008); *Nurr77*, que actúa como un factor de transcripción nuclear, activado por la cascada de ERK en procesos de crecimiento celular; o *Rrad*, cuya expresión está favorecida por la insulina en corazones sanos (Coletta et al. 2008).

De los niveles de expresión génica en el corazón de los individuos hemicigotos para GRK2 también cabría esperar información acerca del tipo de hipertrofia detectado en estos animales. Así, *Rrad*, cuya expresión

está incrementada en estos corazones, se encuentra reprimida en corazones con fallo cardíaco (Chang et al. 2007). Además, en los ratones GRK2+/- también está aumentada la expresión de Aquaporina 7, implicada en la captación de glicerol, y el transportador de glucosa Glut3. Puesto que el glicerol y la glucosa son sustratos energéticos indispensables en el corazón en condiciones fisiológicas, y que un factor determinante en la génesis de fallo cardíaco es la privación de energía disponible, con cambios en la expresión génica que alteran el metabolismo energético y debilitan el músculo cardíaco (Gladka et al. 2009), la inducción de estos genes podría ayudar a explicar por qué la hipertrofia detectada es de tipo no patológico. De hecho, ratones deficientes en *Aqp7* presentan una peor adaptación miocárdica a la sobrecarga de presión, y como tal desarrollan una excesiva hipertrofia miocárdica que degenera en fallo cardíaco (Hibuse et al. 2009).

En línea con estos datos, también está incrementada en los animales GRK2+/- la expresión de genes que mantienen la función contráctil como *Prox1* y *Ada*, y de marcadores de funcionalidad cardíaca como *SERCA2* y actina cardíaca.

Otra proteína que puede tener acción cardio-protectora, al inhibir la señalización β -adrenérgica, es la fosfodiesterasa de cAMP *PDE4B*, que también está sobreexpresada en los corazones GRK2+/- . La desensibilización β -adrenérgica está acompañada por una reducción de la expresión de fosfodiesterasas de cAMP y por tanto una alterada modulación de la señal cAMP, mientras que se ha observado una reducción de *PDE4B* en cardiomiocitos hipertróficos por sobrecarga neurohumoral (Abi-Gerges et al. 2009).

Otras proteínas cuya expresión está aumentada en los ratones GRK2+/- son calgranulina A y B (*S100A8/9*), básicas para el desarrollo y la función cardiovascular normal (Kraus et al. 2009). Sin embargo, también se ha descrito que un aumento en calgranulina A/B en cardiomiocitos reduce la fracción de eyección y promueve hipertrofia, y provoca una disminución en el flujo de calcio dentro del cardiomiocito, posiblemente a través de *SERCA2a*, impidiendo su correcta contracción (Boyd et al. 2008). Dado que no detectamos problemas funcionales significativos en la contracción de estos corazones, otra posibilidad es que el incremento en la expresión de Calgranulina A/B se deba a la

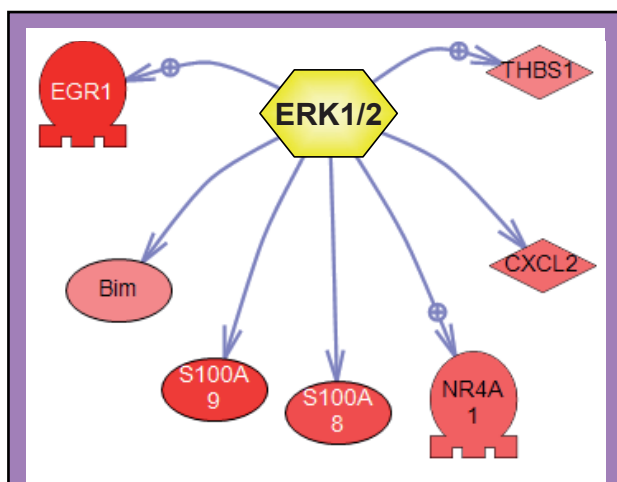


Fig. D-4. Algunos de los genes cuya expresión está inducida en los ratones GRK2+/- vs WT a los 9 meses de edad están modulados positivamente por ERK. La figura se realizó analizando los resultados del microarray con la aplicación Pathway Studio. EGR1 (del inglés *Early Growth Response factor 1*), Bim (BCL2-like 11), S100A8 (Calgranulina A), S100A9 (Calgranulina B), NR4A1 (del inglés *Nuclear Receptor 4A1*, también conocido como Nur77), CXCL2 (del inglés *Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2*), THBS1 (Trombospondina 1).

presencia de monocitos infiltrados y esté indicando un proceso inflamatorio activo, dado que estas proteínas no se expresan en macrófagos residentes tisulares (Donato 2003). Esto estaría en consonancia con la mayor predisposición de estos ratones a fenómenos inflamatorios, y concordaría con la sobreexpresión de otras proteínas implicadas en inflamación como la citoquina CXCL1, o la proteína MMD, así como la tendencia a una mayor activación de p38 en los ratones GRK2+/- en comparación con los WT a los 9 meses. La posible presencia de un componente de inflamación en los corazones de animales GRK2+/- debe ser estudiado en mayor detalle.

Otro dato que apoya la hipótesis de la hipertrofia compensada es la inducción de la expresión de Hdac9, que experimentalmente suprime la hipertrofia patológica sin afectar al desencadenamiento de hipertrofia fisiológica (Metzger 2002), si bien es cierto que también detectamos la inducción de genes como Ppargc1b, que se encuentra regulado a la alta en situaciones de cardiomiopatía hipertrófica, y parece estar implicado en los cambios en el metabolismo cardíaco que tiene lugar en la transición de hipertrofia a fallo cardíaco (Krishnan et al. 2009).

Al analizar los **genes cuya expresión**

es menor en los GRK2+/- frente a los WT a los 9 meses, se obtiene también información relevante acerca del tipo de hipertrofia detectada. Así, la menor expresión de los genes fetales y de Timp4, inhibidor de metaloproteasas, importante en el remodelado cardíaco y que está sobreexpresado en desórdenes cardiovasculares inflamatorios (Koskivirta et al. 2006) y en fallo cardíaco (Felkin et al. 2006), apoya la hipótesis de que esta hipertrofia no es de tipo patológico.

2.2. Influencia de GRK2 en la señalización celular y desarrollo de hipertrofia cardíaca

Se ha descrito que los ratones GRK2+/-, que se desarrollan con normalidad, presentan una contractilidad cardíaca incrementada en respuesta a β -agonistas (Rockman et al. 1998). Sin embargo, dadas las múltiples funciones celulares de GRK2, aparte de la modulación de GPCRs, podría suceder que los efectos de la reducción en los niveles de GRK2 a nivel cardíaco no se limitasen a las funciones estrictamente contráctiles.

Nosotros hemos mostrado que la reducción de los niveles de la proteína GRK2 en ratones hemicigotos induce el desarrollo de una moderada **hipertrofia cardíaca** temprana con la edad, que aparece a los 9 meses, y parece ser de tipo compensado, dado que no existe presencia de fibrosis o disfunción cardíaca aparente según un estudio ecocardiográfico, no hay variación (BNP) e incluso se aprecia una reducción (ANP, actina α -esquelética) en la expresión de genes fetales, y se aprecia un aumento en la expresión de marcadores de funcionalidad cardíaca, como se ha discutido anteriormente.

La hipertrofia detectada en los animales GRK2+/- de 9 meses de edad no parece ser debida a alteraciones en la **presión arterial**, puesto que no se aprecian diferencias significativas entre los animales WT y GRK2+/- en lo que respecta a este parámetro. En cambio, la **sobreactivación a nivel basal de vías de señalización cardioprotectoras**, como la ruta de MEK-ERK o la vía de insulina, sí podría ser la base del desarrollo de esta hipertrofia en estos ratones GRK2+/-.

Con respecto a la **vía de insulina**, estudios en ratones modificados genéticamente han demostrado que tanto IGF1R como el receptor de la Insulina son esenciales tanto para el desarrollo como para la correcta funcionalidad cardíacas (revisado en (Catalucci et al. 2008)). Nuestros datos indican, coherentemente con resultados previos en otros tipos celulares, que sugerían que GRK2 inhibe la vía de insulina a diferentes niveles, que los ratones GRK2+/- muestran una mejor activación de esta vía en corazón y, por tanto, una cierta cardioprotección.

Ratones KO para el receptor de insulina o para Akt, o transgénicos para un dominante negativo de PI3K, desarrollan hipertrofia cardíaca al mismo nivel que sus respectivos controles cuando se les somete a estímulos patológicos, pero son incapaces de desarrollar hipertrofia en respuesta a ejercicio, por lo que parece que estas proteínas señalizan para un tipo de crecimiento de tipo exclusivamente fisiológico (Bertrand et al. 2008; Catalucci et al. 2008). Los efectos por los que la insulina promueve hipertrofia de tipo compensado se deben a dos rutas principales: la fosforilación de sustratos tipo IRS1 y 2 con reclutamiento de activadores de la ruta de ERK, y la activación de la isoforma α de la PI3K, y posterior estimulación de Akt de manera aguda, dado que, aunque los ratones transgénicos para Akt desarrollan también hipertrofia fisiológica, ésta se transforma en patológica cuando la sobreexpresión se mantiene de forma más crónica en el tiempo (ver referencias en Catalucci et al. 2008). En este sentido, los menores niveles de expresión de GRK2 en los corazones GRK2+/- parecen evocar una mayor estimulación de la vía ERK (ver más adelante), y el efecto de una activación no permanente de Akt. Esto sería coherente con nuestros datos, en los que no detectamos activación de Akt cardíaca, ni con la edad ni en los GRK2+/- con respecto a los WT.

Sin embargo, los corazones de los ratones GRK2+/- muestran hipersensibilidad a insulina cuando ésta se administra de manera aguda, con un mayor incremento en la fosforilación de varios componentes de esta ruta a diferentes niveles. El hecho de que estos animales respondan con mayor intensidad a la insulina, hormona cuyos niveles en sangre son oscilantes, puede explicar los beneficios cardioprotectores observados en ratones GRK2+/-, ya que derivarían en una activación de Akt de tipo transitorio con la consiguiente hipertrofia

fisiológica.

El fenómeno de resistencia a insulina se ha descrito como un factor de riesgo independiente e importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Bertrand et al. 2008). En este sentido, el hecho de que una inhibición sistémica de GRK2 parezca ayudar a incrementar los efectos cardioprotectores de la insulina, podría tener interés a nivel farmacológico: la inhibición de GRK2 podría contrarrestar, al menos en parte, los efectos adversos que la resistencia a insulina causa en el corazón.

Además, el aumento que detectamos en los niveles de GRK2 en linfocitos periféricos de pacientes con síndrome metabólico/resistencia a insulina sugiere que existen mecanismos moleculares que incrementan los niveles de GRK2 en pacientes con intolerancia a glucosa. Puesto que se ha descrito que los niveles de expresión y actividad de GRK2 en linfocitos periféricos son un reflejo de la expresión y actividad de GRK2 cardíaca (Iaccarino et al. 2005), si el aumento en los niveles de GRK2 sucediese también en tejido cardíaco, tal y como detectamos con el envejecimiento en ratones C57BL/6 y se ha observado en diversas patologías cardiovasculares (Dorn 2009), estos niveles elevados de GRK2 miocárdica podrían estar no sólo alterando las respuestas mediadas por GPCR, sino también reduciendo las respuestas cardioprotectoras de la insulina y alterando la interfase MEK/ERK en este tejido (ver más adelante), promoviendo un incremento en la disfunción y una posible hipertrofia de tipo patológico.

En cuanto a la **ruta de MEK-ERK**, esta vía está también implicada en la generación de hipertrofia cardíaca de tipo compensado en modelos murinos (Bueno et al. 2000), como ya se ha mencionado. Es de destacar que ratones transgénicos para una forma activada de MEK desarrollan hipertrofia compensada, mientras que inhibidores adenovirales de esta ruta, o la sobreexpresión de fosfatasa específicas (DUSP6) reducen la respuesta hipertrófica (Dorn et al. 2005; Barry et al. 2008). El síndrome de Noonan, la causa monogénica más frecuente de enfermedad cardíaca congénita, cursa con miocardiopatía hipertrófica y su base molecular radica en mutaciones en un activador de MEK (Raf1) que impiden la unión a una molécula inhibitoria (14-3-3). Por último, tres estudios

independientes describen que la actividad de ERK se reduce tras implantación de sistemas de ayuda mecánica en pacientes con fallo cardíaco en un fenómeno paralelo con la regresión de la hipertrofia (ver referencias en Dorn et al. 2005). De manera coherente con estos datos, nosotros detectamos que la cascada de ERK también está sobreactivada en los ratones GRK2+/- a los 9 meses, lo cual sugiere la existencia de una mayor señalización basal para la ruta de ERK en estos animales, posiblemente debida a una mayor eficacia de transducción de las señales de la estimulación neurohumoral endógena. Puesto que no se detectan diferencias significativas en la activación de MEK, estos resultados concuerdan con la modulación específica de la interfase MEK/ERK por GRK2 descrita anteriormente en otros sistemas. La sobre-estimulación de ERK sostenida en el tiempo sería uno de los factores que pueden contribuir al desarrollo de la hipertrofia no patológica que detectamos en este modelo.

Por otro lado, la **ruta de p38** media fundamentalmente procesos patológicos en el corazón. No se detectan diferencias significativas en la fosforilación inhibitoria de p38 en T123 entre los animales silvestres y GRK2+/-, en coherencia con algunas de nuestras observaciones que apuntan a que esta modulación debe de estar teniendo lugar en contextos celulares muy específicos. Sin embargo, en los animales WT se detecta una disminución en los niveles de p38 activada desde los 4 hasta los 9 meses de edad. Puesto que esa reducción en P-TGY-p38 no correlaciona con la fosforilación en T123, es posible que p38 esté siendo inhibida por otro mecanismo (aumento en la actividad de fosfatasa, reducción en la activación, etc), o bien que la fosforilación de p38 por GRK2 sea tan transitoria que no seamos capaces de detectarla en las condiciones de señalización crónica y de baja intensidad que caracterizarían al proceso fisiológico del envejecimiento cardíaco. De nuestros datos se deduce también que en los ratones GRK2+/- la activación de p38 no se modifica de manera significativa con la edad, lo que, dado el papel que se ha descrito para p38 en la etiología y desarrollo de fallo cardíaco (Petrich et al. 2004), de nuevo apoyaría que el tipo de hipertrofia que se detecta en estos ratones es no patológica.

En definitiva, nuestros datos apoyan la

hipótesis de que la activación diferencial de ERK y de la vía de insulina en ratones silvestres vs GRK2+/- puede estar detrás del fenómeno de hipertrofia cardíaca compensada observada en los individuos hemigigotos. La morfometría revela que esta hipertrofia **es de tipo concéntrico, y va acompañada por un aumento en el grosor de los cardiomiocitos**. Si bien la hipertrofia que más suele relacionarse con la disfunción miocárdica es de este tipo, las definiciones del tipo de hipertrofia como concéntrica u excéntrica y como funcional o disfuncional son clasificaciones independientes (Hill et al. 2008) y la catalogación como funcional/disfuncional debe basarse siempre en datos clínicos de funcionalidad cardíaca. En nuestro caso, la fracción de eyección y de acortamiento están preservadas con la edad en ambos grupos de ratones, indicando que el tipo de crecimiento cardíaco que detectamos en los GRK2 +/- no desemboca en una menor funcionalidad del músculo. En el mismo sentido podemos añadir que otros parámetros bioquímicos de disfunción tampoco están alterados: no se detecta fibrosis intersticial en estos animales; la dilatación de la cámara (un fenómeno relacionado con la disfunción cardíaca) tampoco varía significativamente entre los dos genotipos de ratones; y la reexpresión de genes fetales, indicativa de reprogramación tisular patológica, no se observa en ratones GRK2 +/-.

En este contexto, puede ser relevante que detectamos que **los niveles de GRK2 tienden a aumentar ligeramente con la edad** en el corazón, aumento que también ocurre en la aorta de rata durante el envejecimiento en correlación con una mayor desensibilización β -adrenérgica (Schutzer et al. 2001). Otros datos muestran que en el corazón los niveles de GRK2 están aumentados con la edad en los discos intercalares en ratas SHHF, aunque la expresión total no varía (Yi et al. 2005). Tomados en conjunto, los resultados publicados y los obtenidos en este trabajo de tesis apuntan a que el aumento en los niveles de GRK2 con la edad puede resultar en la inhibición de rutas de señalización cardioprotectoras, lo que podría contribuir a los efectos deletéreos que tiene el envejecimiento sobre la funcionalidad cardíaca.

2.3. Modelo propuesto

Considerados globalmente, los resultados mostrados en esta tesis doctoral nos animan a proponer un modelo que sugiere la participación de GRK2 en la **modulación de rutas cardioprotectoras**, en particular mediante la inhibición de las vías de MEK/ERK e insulina.

Los niveles de GRK2 aumentan en la patología cardíaca (revisado en Dorn 2009), siendo éste un evento temprano en el fallo cardíaco, que estaría al menos en parte controlado por el sistema simpático, ya que las catecolaminas provocan un aumento en los niveles de GRK2 (Oyama et al. 2005). Sin embargo, este hecho no explica si estos cambios son parte de las causas que contribuyen al proceso patológico, o bien se trata de un mecanismo por el que el corazón intenta compensar la transición hacia fallo miocárdico.

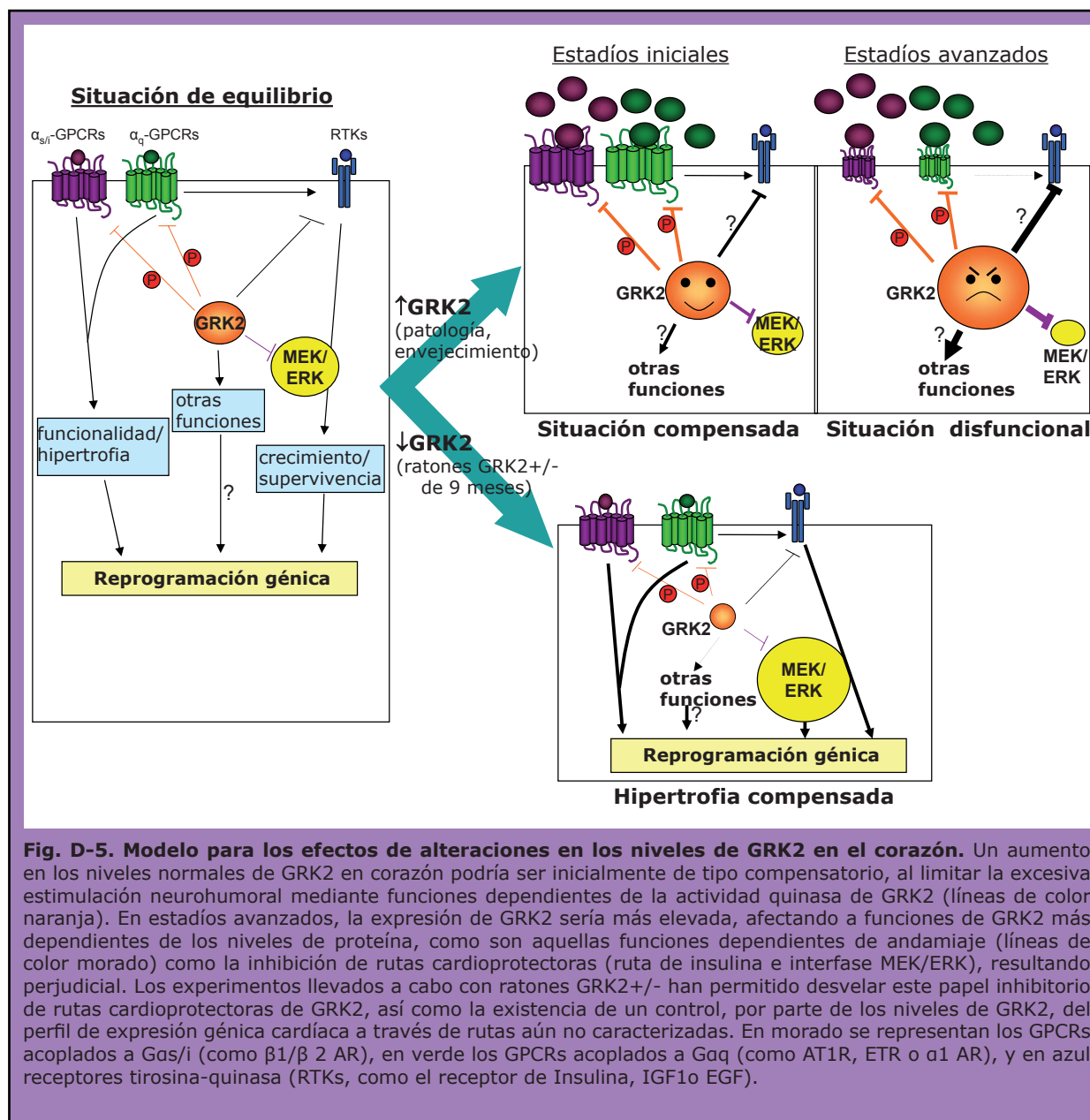
La interpretación de los efectos de cambios en los niveles de GRK2 en la función cardíaca se ha basado hasta la fecha fundamentalmente en su papel en la desensibilización de GPCR cardíacos. Así, la expresión elevada de GRK2 en hipertrofia y fallo cardíaco debería en principio atenuar la estimulación β 1-adrenérgica característica de esas circunstancias. Sin embargo, al demostrarse que la estimulación β 1-adrenérgica sostenida inducía daño cardíaco (Engelhardt et al. 1999), y que determinados agentes β -bloqueantes como el carvedilol constituyen un tratamiento adecuado para pacientes con fallo cardíaco congestivo (Fowler 1993) la inducción de mecanismos que la atenúan, como la regulación al alza de GRK2, podría ser más bien considerada como un proceso compensatorio inicial en respuesta a la sobrecarga adrenérgica. Ahora bien, muy diversos datos apuntan a que la disminución experimental de los niveles/actividad de GRK2 (sobre-expresando la construcción inhibitoria GRK2ct, construcciones silenciadoras de la quinasa o utilizando animales carentes de GRK2 en cardiomiocitos) previene o rescata en muchos casos la disfunción cardíaca (Dorn 2009, y ver más abajo), lo que indicaría un papel patológico, al menos en algunos contextos y/o fases de la enfermedad cardíaca. En este sentido, es interesante destacar que los

agentes β -bloqueantes confieren un beneficio adicional al que proporciona la inhibición de la quinasa utilizando GRK2ct, lo que sugiere que ambos elementos pueden actuar por mecanismos independientes (Harding et al. 2001).

Dados nuestros resultados, proponemos un **modelo (figura D-5)** en el que las **nuevas funciones emergentes de GRK2** deben ser tenidas en consideración a la hora de intentar **explicar las consecuencias fisiológicas y patológicas de una alteración en sus niveles** y en el **diseño de nuevas estrategias terapéuticas**.

En el tejido cardíaco, GRK2 actuaría como **modulador negativo de GPCR** como β 1- y β 2-adrenérgicos, promoviendo su fosforilación dependiente de agonistas. Así, los ratones que sobre-expresan GRK2 en el corazón muestran una contractilidad atenuada y una menor respuesta GPCR, y lo contrario ocurre en ratones hemiciotos para la quinasa (Koch et al. 1995). GRK2 cumple un papel similar en la regulación de GPCRs asociados a G_q (que responden a agonistas tales como angiotensina o endotelina), aunque en este caso también podría atenuar su señal a través de su interacción específica con esta subunidad α (Carman et al. 1999). El grado de fosforilación por GRK2 de algunos de estos receptores, como los β 1- adrenérgicos o de angiotensina, puede determinar también indirectamente la actividad de vías de transmodulación cardioprotectoras, ya que se ha postulado que la disminución de los niveles de GRK2, al permitir la acción de otras GRKs como GRK5, potenciaría vías de señalización arrestinas/ERK o de EGFR/ERK, de carácter neuroprotector (Kim et al. 2005; Noma et al. 2007). Por otra parte, como demostramos en este trabajo, los niveles de GRK2 son importantes reguladores de la interfase **MEK/ERK** y de la señalización de la **insulina**, un importante modulador del crecimiento y la supervivencia cardíaca, y esto puede afectar a la modulación de la **expresión génica cardíaca**. Finalmente, no cabe descartar, dado el **complejo interactoma** de GRK2 (Ribas et al. 2007), que otras funciones celulares adicionales estuvieran implicadas en esta reprogramación génica, así como en otros efectos cardíacos.

El modelo esquematizado en la **figura D-5** puede contribuir a explicar de forma más



integrada diversos resultados publicados en la bibliografía referentes al papel de GRK2 en patologías cardiovasculares.

Así, el **incremento en los niveles de GRK2**, que ocurre con la edad o estadios tempranos de ciertas situaciones patológicas, puede ser **inicialmente beneficioso** por modular negativamente la excesiva señal adrenérgica y otras señales dañinas neurohumorales (angiotensina, etc) que concurren en esas circunstancias, a pesar de inhibir en alguna medida vías cardioprotectoras. Sin embargo, un aumento crónico o mayores incrementos en la expresión a lo largo de la enfermedad puede resultar **perjudicial a largo plazo**, debido no sólo

a un posible desbalance en la modulación de GPCR sino, quizá principalmente, a la **inhibición de rutas cardioprotectoras**. En este sentido, es interesante apuntar que las funciones celulares de GRK2 independientes de actividad quinasa y dependientes de andamiaje, como la inhibición de MEK / ERK que describimos aquí, pueden ser más sensibles a alteraciones en los niveles de GRK2 que otras funciones en las que la actividad quinasa está implicada (fosforilación de GPCR), en las que la eficiencia de la enzima puede no verse tan afectada por cambios eventuales (tanto a la alza como a la baja) en sus niveles. En el caso de la modulación de la señalización de la insulina, que puede

tener tanto componentes dependientes como independientes de la actividad quinasa de GRK2 en distintos ensayos y tipos celulares (Usui et al. 2005; Cipolletta et al. 2009), será importante en el futuro determinar con precisión la contribución de esos componentes en el caso del corazón.

Se ha descrito que los niveles de GRK2 aumentan en el corazón hipertrófico post-infarto (una situación patológica avanzada) sólo en aquellos animales en los que se detectará posteriormente fallo cardíaco con edema pulmonar (Theilade et al. 2003). Nuestros datos sugieren que en estos ratones las vías cardioprotectoras de insulina y MEK/ERK se encontrarían inhibidas, lo que favorecería el desarrollo de la patología. Por el contrario, en ese mismo estudio, la actividad y expresión de GRK2 se encuentran disminuidas en los animales con hipertrofia cardíaca que no desarrollan edema pulmonar, en los que, según nuestra hipótesis, las vías cardioprotectoras estarían por el contrario activadas. Es interesante mencionar también que, en un modelo de ratas que generan espontáneamente hipertensión con fallo cardíaco (SHHF), el declive en la capacidad de respuesta adrenérgica está precedido por un temprano aumento en los niveles de GRK2 (Anderson et al. 1999), que podría promover inactivación de las rutas de insulina y MEK/ERK, favoreciendo así la progresión patológica.

Por su parte, el grupo de Raake et al. ha investigado el efecto de la ablación de GRK2 en cardiomiocitos antes y después del infarto, utilizando ratones transgénicos inducibles, y mostró que si se bloquea la expresión de GRK2 antes del infarto, se previene el remodelado maladaptativo posterior y se mantiene la respuesta adrenérgica (Raake et al. 2008), lo que estaría en línea con nuestros resultados, en los que la reducción de niveles de GRK2 en ratones sanos (como los que se emplean en este estudio) activa rutas cardioprotectoras, modifica patrones de expresión génica y da lugar a un tipo de hipertrofia no patológica. En el mismo sentido, estos autores encuentran que si se bloquea la expresión de GRK2 diez días después del infarto, aumenta la supervivencia, la contractilidad y se detiene el remodelado ventricular.

Dada la falta de inhibidores farmacológicos para GRK2, muchos otros trabajos que concluyen que la inhibición de

GRK2 previene el desarrollo de cardiopatías se han llevado a cabo sobreexpresando la construcción GRK2ct. Se postula que GRK2ct, al secuestrar los dímeros $\beta\gamma$, impide el reclutamiento de GRK2 endógena a la membrana, disminuyendo su actividad frente a GPCR activados (Koch et al. 1995). En efecto, Rockman et al. sobreexpresaron la construcción GRK2ct en el modelo GRK2(+/-), y observaron que al igual que sucede con los ratones que sobreexpresaban sólo GRK2ct, éstos presentaban una mayor contractilidad cardíaca en respuesta a estímulos β -adrenérgicos o Angiotensina II (Rockman et al. 1998). Sin embargo, GRK2ct no revierte la hipertrofia cardíaca en todos los modelos estudiados (no lo hace en ratones que sobreexpresan Gq o un dominante negativo de CREB, por ejemplo, ver revisión de (Penela et al. 2006)), y los mecanismos que median los efectos de GRK2ct sobre la función cardíaca han sido muy debatidos, ya que podría influir también sobre un número indeterminado de vías de señalización celular, bloqueando otras señales dependientes de $\beta\gamma$ (como la vía de PI3K o algunos canales iónicos), re-dirigiendo GRK2 hacia otros sustratos no GPCR, potenciando rutas protectoras de transmodulación o alterando la interacción de GRK2 con otros componentes celulares. La sobreexpresión de GRK2ct en estos ratones posiblemente no afectaría a la interfase MEK/ERK, puesto que la transfección de GRK2ct no tiene efecto inhibitorio sobre ERK en otros tipos celulares (Jimenez-Sainz et al. 2006). Será muy interesante investigar, además de las cuestiones anteriores, si la sobreexpresión de este fragmento modifica de alguna forma la modulación de la vía de la insulina por GRK2.

En definitiva, el **impacto global** de cambios en los niveles de GRK2 en situaciones fisiológicas y patológicas en la función/disfunción cardíaca dependerá de cómo se altere el equilibrio u homeostasis entre sus diversos cometidos celulares, dependiendo también de otros estímulos presentes y del contexto fisiopatológico. En este sentido, cabe destacar que, en ausencia de otras alteraciones concurrentes, la mera sobreexpresión de GRK2 en corazón no parece dar lugar "per se" a patología (Koch et al. 1995). Por tanto, se precisa aún un **conocimiento más profundo de los mecanismos de acción de GRK2** en diferentes tipos celulares cardíacos para predecir mejor las

implicaciones fisiopatológicas de alteraciones en su expresión.

Desde el punto de vista **terapéutico**, nuestra hipótesis apoya que una menor expresión de esta proteína puede tener efectos beneficiosos en situaciones de fallo cardíaco, en particular en estadios no iniciales, cuando el aumento en los niveles de GRK2 sea ya un problema para las rutas cardioprotectoras. Puede especularse que este tipo de aproximación resultaría de interés también en pacientes con síndrome metabólico o diabetes tipo II con problemas cardiovasculares, como beneficio terapéutico añadido de una posible terapia con

inhibidores de GRK2 usados para incrementar la sensibilidad a insulina. Es importante mencionar en este contexto que una inhibición farmacológica de GRK2 que afectara exclusivamente a la actividad catalítica de esta quinasa (como sería el caso de agentes ATP-miméticos específicos), sin alterar sus niveles, no alteraría sustancialmente los efectos celulares de GRK2 dependientes de anclaje, tales como la inhibición de la vía cardio-protectora MEK/ERK aquí descrita. De confirmarse la relevancia funcional de estos efectos de GRK2, deberían favorecerse estrategias (siRNA, adenovirus, fármacos) que condujeran a una menor expresión de esta proteína en circunstancias patológicas.

Conclusiones

1. GRK5 es capaz de modular algunas funciones celulares dependientes de las subunidades $\alpha_{12/13}$ de las proteínas G heterotriméricas. Este efecto tendría lugar a través del dominio RH de GRK5 y sería mediado por la disociación de GRK5 tras la activación de esta GTPasa. La fosforilación de GRK5 en S114, por ERK u otras quinasas, podría estar modulando la unión de GRK5 con $G\alpha_{12}$.

2. GRK2 puede inhibir la ruta de p38MAPK, y cambios en sus niveles afectan a procesos celulares dependientes de esta MAPK como son la diferenciación de células preadipocíticas y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por macrófagos en respuesta a LPS. En ambos procesos se detecta una correlación inversa entre los niveles de p38 activa y los niveles de GRK2 y de p38 fosforilada en la treonina 123. Sin embargo, con los anticuerpos anti-fosfo-T123-p38 disponibles en la actualidad, no ha podido establecerse con claridad la correlación de la señal detectada con los niveles de GRK2 ni con la presencia de diversos estímulos explorados, lo que sugiere la existencia de un **proceso dinámico modulado por otros factores adicionales.**

3. GRK2 es capaz de interaccionar con MEK de manera directa y de inhibir la activación de ERK de una manera independiente de la actividad quinasa de GRK2 en diversos tipos celulares. La regulación de la ruta MEK/ERK por GRK2 depende del contexto celular y probablemente requiere una localización precisa de los complejos GRK2-MEK.

4. Los ratones hemicigotos para GRK2 desarrollan una hipertrofia cardiaca temprana, a los 9 meses de edad, que no se detecta en los controles silvestres. El crecimiento del músculo cardiaco en estos animales GRK2+/- es de tipo concéntrico, y cursa con un aumento en el grosor de los cardiomiocitos, pero sin cambios en el porcentaje de fibrosis. Esta hipertrofia no va acompañada de diferencias en la presión arterial ni de disfunción cardíaca, según un estudio ecocardiográfico. Todo ello sugiere que la hipertrofia detectada **no es de tipo patológico.**

5. La hipertrofia en los animales hemicigotos para GRK2 correlaciona con una mayor fosforilación de GRK2 en la serina 670, y con niveles incrementados de activación de ERK, sin verse alterada la activación de MEK, ni la de p38. Todo ello apunta a una implicación de la inhibición de ERK por GRK2 a nivel de la interfase MEK/ERK.

6. A los 9 meses de edad se detecta una reprogramación en el patrón de expresión génica en los animales GRK2+/- con respecto a los silvestres, con un aumento en la expresión de genes relacionados con acciones cardioprotectoras y una disminución en la expresión de genes con implicaciones patológicas, así como en genes de remodelado cardíaco. En conjunto, estos datos refuerzan la noción de que la hipertrofia temprana detectada en los animales GRK2+/- no es de tipo patológico.

7. La ruta cardioprotectora de la insulina se activa en mayor grado en los corazones de animales hemicigotos para GRK2 en respuesta a un tratamiento agudo con esta hormona. Los animales GRK2+/- son además más tolerantes a glucosa y más sensibles a insulina que los controles silvestres a nivel sistémico. Por otra parte, se detecta un incremento significativo en los niveles de GRK2 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con síndrome metabólico, lo que sugiere una **correlación positiva entre los niveles de GRK2 y el fenómeno de resistencia a insulina.** Todo ello revela un **nuevo papel de GRK2 en la modulación de rutas cardioprotectoras.**

Bibliografía

- Abi-Gerges, A., W. Richter, et al. (2009). "Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals." *Circ Res* **105**(8): 784-92.
- Albig, A. R., T. G. Roy, et al. (2007). "Transcriptome analysis of endothelial cell gene expression induced by growth on matrigel matrices: identification and characterization of MAGP-2 and lumican as novel regulators of angiogenesis." *Angiogenesis* **10**(3): 197-216.
- Anderson, K. M., A. D. Eckhart, et al. (1999). "The myocardial beta-adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats." *Hypertension* **33**(1 Pt 2): 402-7.
- Anis, Y., O. Leshem, et al. (2004). "Antidiabetic effect of novel modulating peptides of G-protein-coupled kinase in experimental models of diabetes." *Diabetologia* **47**(7): 1232-44.
- Anliker, B. and J. Chun (2004). "Lysophospholipid G protein-coupled receptors." *J Biol Chem* **279**(20): 20555-8.
- Baameur, F., D. H. Morgan, et al. (2009). "Role for the RH Domain of GRK5 and 6 in {beta}2-Adrenergic Receptor and Rhodopsin Phosphorylation." *Mol Pharmacol*.
- Barry, S. P., S. M. Davidson, et al. (2008). "Molecular regulation of cardiac hypertrophy." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(10): 2023-39.
- Barthet, G., G. Carrat, et al. (2009). "Beta-arrestin1 phosphorylation by GRK5 regulates G protein-independent 5-HT4 receptor signalling." *Embo J* **28**(18): 2706-18.
- Ben-Levy, R., S. Hooper, et al. (1998). "Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2." *Curr Biol* **8**(19): 1049-57.
- Benard, O., Z. Naor, et al. (2001). "Role of dynamin, Src, and Ras in the protein kinase C-mediated activation of ERK by gonadotropin-releasing hormone." *J Biol Chem* **276**(7): 4554-63.
- Bertrand, L., S. Horman, et al. (2008). "Insulin signalling in the heart." *Cardiovasc Res* **79**(2): 238-48.
- Biondi, R. M. and A. R. Nebreda (2003). "Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions." *Biochem J* **372**(Pt 1): 1-13.
- Bookout, A. L., A. E. Finney, et al. (2003). "Targeting Gbetagamma signaling to inhibit prostate tumor formation and growth." *J Biol Chem* **278**(39): 37569-73.
- Boyd, J. H., B. Kan, et al. (2008). "S100A8 and S100A9 mediate endotoxin-induced cardiomyocyte dysfunction via the receptor for advanced glycation end products." *Circ Res* **102**(10): 1239-46.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Bragado, P., A. Armesilla, et al. (2007). "Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation." *Apoptosis* **12**(9): 1733-42.
- Brinks, H. L. and A. D. Eckhart (2010). "Regulation of GPCR signaling in Hypertension." *Biochim Biophys Acta*.
- Bueno, O. F., L. J. De Windt, et al. (2000). "The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice." *Embo J* **19**(23): 6341-50.
- Bueno, O. F. and J. D. Molkentin (2002). "Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death." *Circ Res* **91**(9): 776-81.
- Buermans, H. P., E. M. Redout, et al. (2005). "Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure." *Physiol Genomics* **21**(3): 314-23.
- Buhl, A. M., N. L. Johnson, et al. (1995). "G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly." *J Biol Chem* **270**(42): 24631-4.
- Buitrago, M., K. Lorenz, et al. (2005). "The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy." *Nat Med* **11**(8): 837-44.
- Bulavin, D. V. and A. J. Fornace, Jr. (2004). "p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor." *Adv Cancer Res* **92**: 95-118.
- Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, et al. (2001). "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase." *Nature* **411**(6833): 102-7.
- Bulavin, D. V., S. Saito, et al. (1999). "Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation." *Embo J* **18**(23): 6845-54.
- Carman, C. V., J. L. Parent, et al. (1999). Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem*: 34483-92.
- Casar, B., A. Pinto, et al. (2008). "Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes." *Mol Cell* **31**(5): 708-21.
- Catalucci, D., M. V. Latronico, et al. (2008). "Physiological myocardial hypertrophy: how and why?" *Front Biosci* **13**: 312-24.
- Cipolletta, E., A. Campanile, et al. (2009). "The G protein coupled receptor kinase 2 plays an essential role in beta-adrenergic receptor-induced insulin resistance." *Cardiovasc Res* **84**(3): 407-15.
- Cohen, P. (2009). "Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs." *Curr Opin Cell Biol* **21**(2): 317-24.
- Cohn, H. I., Y. Xi, et al. (2009). "G protein-coupled receptor kinase 2 expression and activity are associated with blood pressure in black Americans." *Hypertension* **54**(1): 71-6.
- Coletta, D. K., B. Balas, et al. (2008). "Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle in vivo." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**(5): E910-7.
- Communal, C., W. S. Colucci, et al. (2002). "Reciprocal modulation of mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 and 2 in failing human myocardium." *J Card Fail* **8**(2): 86-92.
- Cook, S. A., P. H. Sugden, et al. (1999). "Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease." *J Mol Cell Cardiol* **31**(8): 1429-34.
- Coulthard, L. R., D. E. White, et al. (2009). "p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms

- to therapeutics." *Trends Mol Med* **15**(8): 369-79.
- Cuadrado, A., V. Lafarga, et al. (2007). "A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis." *EMBO J* **26**(8): 2115-26.
- Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1358-75.
- Chang, L., J. Zhang, et al. (2007). "Rad GTPase deficiency leads to cardiac hypertrophy." *Circulation* **116**(25): 2976-83.
- Chen, Q. M., V. C. Tu, et al. (2001). "Molecular mechanisms of cardiac hypertrophy induced by toxicants." *Cardiovasc Toxicol* **1**(4): 267-83.
- Chen, X., H. Zhu, et al. (2010). "G-protein-coupled receptor kinase 5 phosphorylates p53 and inhibits DNA damage-induced apoptosis." *J Biol Chem*.
- Choi, D. J., W. J. Koch, et al. (1997). "Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase." *J Biol Chem* **272**(27): 17223-9.
- Dard, N. and M. Peter (2006). "Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms." *Bioessays* **28**(2): 146-56.
- De Blasi, A., G. Parruti, et al. (1995). "Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. Selective increase of beta-adrenergic receptor kinase 1 and 2." *J Clin Invest* **95**(1): 203-10.
- Defea, K. (2008). "Beta-arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction." *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**: S298-309.
- Degousee, N., J. Martindale, et al. (2003). "MAP kinase kinase 6-p38 MAP kinase signaling cascade regulates cyclooxygenase-2 expression in cardiac myocytes in vitro and in vivo." *Circ Res* **92**(7): 757-64.
- Devereux, R. B., M. J. Roman, et al. (2000). "Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study." *Circulation* **101**(19): 2271-6.
- Dhanasekaran, D. N. and G. L. Johnson (2007). "MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting." *Oncogene* **26**(22): 3097-9.
- Dolado, I., A. Swat, et al. (2007). "p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis." *Cancer Cell* **11**(2): 191-205.
- Donato, R. (2003). "Intracellular and extracellular roles of S100 proteins." *Microsc Res Tech* **60**(6): 540-51.
- Dong, C., R. J. Davis, et al. (2002). "MAP kinases in the immune response." *Annu Rev Immunol* **20**: 55-72.
- Dorn, G. W., 2nd (2007). "The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy." *Hypertension* **49**(5): 962-70.
- Dorn, G. W., 2nd (2009). "Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling." *Cardiovasc Res* **81**(3): 465-73.
- Dorn, G. W., 2nd (2009). "GRK mythology: G-protein receptor kinases in cardiovascular disease." *J Mol Med* **87**(5): 455-63.
- Dorn, G. W., 2nd and T. Force (2005). "Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy." *J Clin Invest* **115**(3): 527-37.
- Dorsam, R. T. and J. S. Gutkind (2007). "G-protein-coupled receptors and cancer." *Nat Rev Cancer* **7**(2): 79-94.
- Eckhart, A. D., T. Ozaki, et al. (2002). "Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in transgenic mice attenuates beta-adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure." *Mol Pharmacol* **61**(4): 749-58.
- Eglen, R. M. (2005). "Emerging concepts in GPCR function--the influence of cell phenotype on GPCR pharmacology." *Proc West Pharmacol Soc* **48**: 31-4.
- Elorza, A., P. Penela, et al. (2003). "MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2." *J Biol Chem* **278**(31): 29164-73.
- Elorza, A., S. Sarnago, et al. (2000). "Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases." *Mol Pharmacol* **57**(4): 778-83.
- Engelhardt, S., L. Hein, et al. (1999). "Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 7059-64.
- Engelman, J. A., A. H. Berg, et al. (1999). "Constitutively active mitogen-activated protein kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis." *J Biol Chem* **274**(50): 35630-8.
- Engelman, J. A., M. P. Lisanti, et al. (1998). "Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis." *J Biol Chem* **273**(48): 32111-20.
- Enslin, H., D. M. Branch, et al. (2000). "Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms." *Embo J* **19**(6): 1301-11.
- Enslin, H. and R. J. Davis (2001). "Regulation of MAP kinases by docking domains." *Biol Cell* **93**(1-2): 5-14.
- Feldman, R. D. (2002). "Deactivation of vasodilator responses by GRK2 overexpression: a mechanism or the mechanism for hypertension?" *Mol Pharmacol* **61**(4): 707-9.
- Felkin, L. E., E. J. Birks, et al. (2006). "A quantitative gene expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the myocardium of patients with deteriorating heart failure requiring left ventricular assist device support." *J Heart Lung Transplant* **25**(12): 1413-9.
- Force, T., C. M. Pombo, et al. (1996). "Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease." *Circ Res* **78**(6): 947-53.
- Fowler, M. B. (1993). "Beta-blockers in heart failure: potential of carvedilol." *J Hum Hypertens* **7 Suppl 1**: S62-7.
- Frank, K. F., B. Bolck, et al. (2003). "Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation." *Cardiovasc Res* **57**(1): 20-7.
- Freeman, K., C. Colon-Rivera, et al. (2001). "Progression from hypertrophic to dilated cardiomyopathy in mice that express a mutant myosin transgene." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(1): H151-9.
- Fujisawa, M., K. Oguchi, et al. (2005). "Protective effect of hawthorn fruit on murine experimental colitis." *Am J Chin Med* **33**(2): 167-80.
- Gaddam, K. K., A. Verma, et al. (2009). "Hypertension

- and cardiac failure in its various forms." *Med Clin North Am* **93**(3): 665-80.
- Gao, J., J. Li, et al. (2005). "Regulation of EGF-induced ERK/MAPK activation and EGFR internalization by G protein-coupled receptor kinase 2." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**(8): 525-31.
- Gardner, D. G. (2003). "Natriuretic peptides: markers or modulators of cardiac hypertrophy?" *Trends Endocrinol Metab* **14**(9): 411-6.
- Gladka, M., H. El Azzouzi, et al. (2009). "Aquaporin 7: the glycerol aqueductus in the heart." *Cardiovasc Res* **83**(1): 3-4.
- Gohla, A., R. Harhammer, et al. (1998). "The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho." *J Biol Chem* **273**(8): 4653-9.
- Goldsmith, Z. G. and D. N. Dhanasekaran (2007). "G protein regulation of MAPK networks." *Oncogene* **26**(22): 3122-42.
- Gonzalez, A., B. Lopez, et al. (2009). "Biochemical markers of myocardial remodelling in hypertensive heart disease." *Cardiovasc Res* **81**(3): 509-18.
- Green, H. and O. Kehinde (1975). "An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion." *Cell* **5**(1): 19-27.
- Griswold, D. E., L. M. Hillegass, et al. (1996). "Evaluation of human cytokine production and effects of pharmacological agents in a heterologous system in vivo." *J Immunol Methods* **195**(1-2): 1-5.
- Gros, R., J. L. Benovic, et al. (1997). "G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension." *J Clin Invest* **99**(9): 2087-93.
- Gutkind, J. S. (1998). "Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration." *Oncogene* **17**(11 Reviews): 1331-42.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." *Science* **279**(5350): 509-14.
- Hamm, H. E. and A. M. Preiner (2004). "G Protein Signaling: Insights from New Structures." *Sci. STKE* **2004**(218): re3.
- Harada, K., I. Komuro, et al. (1998). "Acute pressure overload could induce hypertrophic responses in the heart of angiotensin II type 1a knockout mice." *Circ Res* **82**(7): 779-85.
- Harding, A., T. Tian, et al. (2005). "Subcellular localization determines MAP kinase signal output." *Curr Biol* **15**(9): 869-73.
- Harding, V. B., L. R. Jones, et al. (2001). "Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10): 5809-14.
- Harris, D. M., H. I. Cohn, et al. (2008). "GPCR signalling in hypertension: role of GRKs." *Clin Sci (Lond)* **115**(3): 79-89.
- Heineke, J. and J. D. Molkentin (2006). "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(8): 589-600.
- Hibuse, T., N. Maeda, et al. (2009). "The heart requires glycerol as an energy substrate through aquaporin 7, a glycerol facilitator." *Cardiovasc Res* **83**(1): 34-41.
- Higuchi, S., H. Ohtsu, et al. (2007). "Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology." *Clin Sci (Lond)* **112**(8): 417-28.
- Hill, J. A. and E. N. Olson (2008). "Cardiac plasticity." *N Engl J Med* **358**(13): 1370-80.
- Ho, J., E. Cocolakis, et al. (2005). "The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction." *Embo J* **24**(18): 3247-58.
- Huang, C. C., K. Yoshino-Koh, et al. (2009). "A surface of the kinase domain critical for the allosteric activation of G protein-coupled receptor kinases." *J Biol Chem* **284**(25): 17206-15.
- Hui, L., L. Bakiri, et al. (2007). "p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway." *Nat Genet* **39**(6): 741-9.
- Iaccarino, G., E. Barbato, et al. (2005). "Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure." *Eur Heart J* **26**(17): 1752-8.
- Iaccarino, G., E. D. Tomhave, et al. (1998). "Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by beta-adrenergic receptor stimulation and blockade." *Circulation* **98**(17): 1783-9.
- Ilany, J., P. J. Bilan, et al. (2006). "Overexpression of Rad in muscle worsens diet-induced insulin resistance and glucose intolerance and lowers plasma triglyceride level." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(12): 4481-6.
- Izumo, S., A. M. Lompre, et al. (1987). "Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals." *J Clin Invest* **79**(3): 970-7.
- Jaber, M., W. J. Koch, et al. (1996). "Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 12974-9.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247-69.
- Jeong, M. Y., K. Kinugawa, et al. (2005). "AFos dissociates cardiac myocyte hypertrophy and expression of the pathological gene program." *Circulation* **111**(13): 1645-51.
- Ji, R. R., R. W. t. Gereau, et al. (2009). "MAP kinase and pain." *Brain Res Rev* **60**(1): 135-48.
- Jimenez-Sainz, M. C., C. Murga, et al. (2006). "G Protein-coupled Receptor Kinase 2 Negatively Regulates Chemokine Signaling at a Level Downstream from G Protein Subunits." *Mol Biol Cell* **17**(1): 25-31.
- Johnson, L. R., M. G. Scott, et al. (2004). "G protein-coupled receptor kinase 5 contains a DNA-binding nuclear localization sequence." *Mol Cell Biol* **24**(23): 10169-79.
- Jurado-Pueyo, M., P. M. Campos, et al. (2008). "GRK2-dependent desensitization downstream of G proteins." *J Recept Signal Transduct Res* **28**(1-2): 59-70.
- Kacimi, R. and A. M. Gerdes (2003). "Alterations in G protein and MAP kinase signaling pathways during cardiac remodeling in hypertension and heart failure." *Hypertension* **41**(4): 968-77.
- Kaftan, H. A., H. Evrengul, et al. (2006). "Effect of insulin resistance on left ventricular structural changes in hypertensive patients." *Int Heart J* **47**(3): 391-400.

- Kaminska, B. (2005). "MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits." *Biochim Biophys Acta* **1754**(1-2): 253-62.
- Kang, M., K. Y. Chung, et al. (2007). "G-protein coupled receptor signaling in myocardium: not for the faint of heart." *Physiology (Bethesda)* **22**: 174-84.
- Karin, M. (2005). "Inflammation-activated protein kinases as targets for drug development." *Proc Am Thorac Soc* **2**(4): 386-90; discussion 394-5.
- Kawashima, K. and T. Fujii (2003). "The lymphocytic cholinergic system and its biological function." *Life Sci* **72**(18-19): 2101-9.
- Keller, E. T., Z. Fu, et al. (2004). "The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease." *Biochem Pharmacol* **68**(6): 1049-53.
- Kelly, P., B. J. Moeller, et al. (2006). "The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(21): 8173-8.
- Keys, J. R. and W. J. Koch (2004). "The adrenergic pathway and heart failure." *Recent Prog Horm Res* **59**: 13-30.
- Khoury SJ, B. P., Koch WJ, Kolattukudy P (2002). "Myocardial overexpression of the cardiac betha-adrenergic receptor kinase-1 inhibitor delays the development of cardiomyopathy induced by myocardial expression of monocyte chemo-tactic protein-1 (MCP-1)." *J Am Coll Cardiol* **39**: 164.
- Kim, J., S. Ahn, et al. (2005). "Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(5): 1442-7.
- King, D. W., R. Steinmetz, et al. (2003). "Differential expression of GRK isoforms in nonmalignant and malignant human granulosa cells." *Endocrine* **22**(2): 135-42.
- Kleibeuker, W., M. Jurado-Pueyo, et al. (2008). "Physiological changes in GRK2 regulate CCL2-induced signaling to ERK1/2 and Akt but not to MEK1/2 and calcium." *J Neurochem* **104**(4): 979-92.
- Kleibeuker, W., A. Ledebuer, et al. (2007). "A role for G protein-coupled receptor kinase 2 in mechanical allodynia." *Eur J Neurosci* **25**(6): 1696-704.
- Koch, W. J., R. J. Lefkowitz, et al. (2000). "Functional consequences of altering myocardial adrenergic receptor signaling." *Annu Rev Physiol* **62**: 237-60.
- Koch, W. J., H. A. Rockman, et al. (1995). "Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor." *Science* **268**(5215): 1350-3.
- Kohm, A. P. and V. M. Sanders (2001). "Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo." *Pharmacol Rev* **53**(4): 487-525.
- Kolch, W. (2005). "Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 827-37.
- Koskivirta, I., O. Rahkonen, et al. (2006). "Tissue inhibitor of metalloproteinases 4 (TIMP4) is involved in inflammatory processes of human cardiovascular pathology." *Histochem Cell Biol* **126**(3): 335-42.
- Kranenburg, O., I. Verlaan, et al. (1999). "Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase." *J Biol Chem* **274**(50): 35301-4.
- Krasel, C., S. Dammeier, et al. (2001). "Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin." *J Biol Chem* **276**(3): 1911-5.
- Kraus, C., D. Rohde, et al. (2009). "S100A1 in cardiovascular health and disease: closing the gap between basic science and clinical therapy." *J Mol Cell Cardiol* **47**(4): 445-55.
- Krief, S., J. F. Faivre, et al. (1999). "Identification and characterization of cvHsp. A novel human small stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues." *J Biol Chem* **274**(51): 36592-600.
- Krishnan, J., M. Suter, et al. (2009). "Activation of a HIF1alpha-PPARGgamma axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy." *Cell Metab* **9**(6): 512-24.
- Kumar, R. N., S. K. Shore, et al. (2006). "Neoplastic transformation by the gep oncogene, Galpha12, involves signaling by STAT3." *Oncogene* **25**(6): 899-906.
- Kyoi, S., H. Otani, et al. (2006). "Opposing effect of p38 MAP kinase and JNK inhibitors on the development of heart failure in the cardiomyopathic hamster." *Cardiovasc Res* **69**(4): 888-98.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* **81**(2): 807-69.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Landry, Y., N. Niederhoffer, et al. (2006). "Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling." *Curr Med Chem* **13**(1): 51-63.
- Lang, K. S., S. Fillon, et al. (2002). "Stimulation of TNF alpha expression by hyperosmotic stress." *Pflugers Arch* **443**(5-6): 798-803.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." *Nature* **372**(6508): 739-46.
- Leenen, F. H., R. White, et al. (2001). "Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(6): H2410-6.
- Lefkowitz, R. J. (2000). "The superfamily of heptahelical receptors." *Nat Cell Biol* **2**(7): E133-6.
- Lefkowitz, R. J. and S. K. Shenoy (2005). "Transduction of receptor signals by beta-arrestins." *Science* **308**(5721): 512-7.
- Lemaire, R., G. Farina, et al. (2004). "Mutant fibrillin 1 from tight skin mice increases extracellular matrix incorporation of microfibril-associated glycoprotein 2 and type I collagen." *Arthritis Rheum* **50**(3): 915-26.
- Lemke, L. E., L. J. Bloem, et al. (2001). "Decreased p38 MAPK activity in end-stage failing human myocardium: p38 MAPK alpha is the predominant isoform expressed in human heart." *J Mol Cell Cardiol* **33**(8): 1527-40.
- Levy, D., R. J. Garrison, et al. (1990). "Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study." *N Engl J Med* **322**(22): 1561-6.

- Lewis, T. S., P. S. Shapiro, et al. (1998). "Signal transduction through MAP kinase cascades." *Adv Cancer Res* **74**: 49-139.
- Li, J., E. J. Miller, et al. (2005). "AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart." *Circ Res* **97**(9): 872-9.
- Li, L., J. Liu, et al. (2008). "GRK5 deficiency exaggerates inflammatory changes in TgAPPsw mice." *J Neuroinflammation* **5**: 24.
- Liao, P., D. Georgakopoulos, et al. (2001). "The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12283-8.
- Liggett, S. B. (2005). "Lymphocyte GRK levels as biomarkers in heart failure." *Eur Heart J* **26**(17): 1695-6.
- Liu, S., R. T. Premont, et al. (2005). "A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension." *Nat Med* **11**(9): 952-8.
- Lodowski, D. T., J. A. Pitcher, et al. (2003). "Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma." *Science* **300**(5623): 1256-62.
- Lombardi, M. S., A. Kavelaars, et al. (2001). "Adjuvant arthritis induces down-regulation of G protein-coupled receptor kinases in the immune system." *J Immunol* **166**(3): 1635-40.
- Lombardi, M. S., A. Kavelaars, et al. (2002). "Oxidative stress decreases G protein-coupled receptor kinase 2 in lymphocytes via a calpain-dependent mechanism." *Mol Pharmacol* **62**(2): 379-88.
- Lombardi, M. S., A. Kavelaars, et al. (1999). "Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis." *Faseb J* **13**(6): 715-25.
- Lorenz, K., M. J. Lohse, et al. (2003). "Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2." *Nature* **426**(6966): 574-9.
- Luttrell, L. M. (2003). "Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors." *J Mol Endocrinol* **30**(2): 117-26.
- Luttrell, L. M., F. L. Roudabush, et al. (2001). "Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2449-54.
- Lymeropoulos, A., G. Rengo, et al. (2007). "Adrenal adrenoceptors in heart failure: fine-tuning cardiac stimulation." *Trends Mol Med* **13**(12): 503-11.
- Lymeropoulos, A., G. Rengo, et al. (2008). "Modulation of adrenal catecholamine secretion by in vivo gene transfer and manipulation of G protein-coupled receptor kinase-2 activity." *Mol Ther* **16**(2): 302-7.
- Ma, X. L., S. Kumar, et al. (1999). "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion." *Circulation* **99**(13): 1685-91.
- Mace, G., M. Miaczynska, et al. (2005). "Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates mu opioid receptor endocytosis." *Embo J* **24**(18): 3235-46.
- Mahdavi, V., A. M. Lompre, et al. (1984). "Cardiac myosin heavy chain isozymic transitions during development and under pathological conditions are regulated at the level of mRNA availability." *Eur Heart J* **5 Suppl F**: 181-91.
- Maillet, M., N. H. Purcell, et al. (2008). "DUSP6 (MKP3) null mice show enhanced ERK1/2 phosphorylation at baseline and increased myocyte proliferation in the heart affecting disease susceptibility." *J Biol Chem* **283**(45): 31246-55.
- Malek, M. H. and I. M. Olfert (2009). "Global deletion of thrombospondin-1 increases cardiac and skeletal muscle capillarity and exercise capacity in mice." *Exp Physiol* **94**(6): 749-60.
- Manke, I. A., A. Nguyen, et al. (2005). "MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation." *Mol Cell* **17**(1): 37-48.
- Mansouri, A., L. D. Ridgway, et al. (2003). "Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells." *J Biol Chem* **278**(21): 19245-56.
- Martini, J. S., P. Raake, et al. (2008). "Uncovering G protein-coupled receptor kinase-5 as a histone deacetylase kinase in the nucleus of cardiomyocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(34): 12457-62.
- Matkovich, S. J., A. Diwan, et al. (2006). "Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and beta-adrenergic signaling." *Circ Res* **99**(9): 996-1003.
- Mayer, G., B. Wulffen, et al. (2008). "An RNA molecule that specifically inhibits G-protein-coupled receptor kinase 2 in vitro." *Rna* **14**(3): 524-34.
- Mayor, F., Jr., M. Jurado-Pueyo, et al. (2007). "Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route." *Cell Cycle* **6**(5): 528-33.
- Meigs, T. E., J. Juneja, et al. (2005). "Selective uncoupling of G alpha 12 from Rho-mediated signaling." *J Biol Chem* **280**(18): 18049-55.
- Mercer, K. E. and C. A. Pritchard (2003). "Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target." *Biochim Biophys Acta* **1653**(1): 25-40.
- Metaye, T., E. Menet, et al. (2002). "Expression and activity of g protein-coupled receptor kinases in differentiated thyroid carcinoma." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(7): 3279-86.
- Metzger, J. M. (2002). "HDAC lightens a heavy heart." *Nat Med* **8**(10): 1078-9.
- Mikule, K., B. Delaval, et al. (2007). "Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest." *Nat Cell Biol* **9**(2): 160-70.
- Mitsui, H., N. Takuwa, et al. (1997). "Dependence of activated Galpha12-induced G1 to S phase cell cycle progression on both Ras/mitogen-activated protein kinase and Ras/Rac1/Jun N-terminal kinase cascades in NIH3T3 fibroblasts." *J Biol Chem* **272**(8): 4904-10.
- Mittelstadt, P. R., J. M. Salvador, et al. (2005). "Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase." *Cell Cycle* **4**(9): 1189-92.
- Molnar, A., A. M. Theodoras, et al. (1997). "Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK." *J Biol Chem* **272**(20): 13229-35.

- Morris, G. E., C. P. Nelson, et al. (2010). "Endothelin signalling in arterial smooth muscle is tightly regulated by G protein-coupled receptor kinase 2." *Cardiovasc Res* **85**(3): 424-33.
- Mudd, J. O. and D. A. Kass (2008). "Tackling heart failure in the twenty-first century." *Nature* **451**(7181): 919-28.
- Murphy, L. O. and J. Blenis (2006). "MAPK signal specificity: the right place at the right time." *Trends Biochem Sci* **31**(5): 268-75.
- Muslin, A. J. (2008). "MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets." *Clin Sci (Lond)* **115**(7): 203-18.
- Nadal-Ginard, B. (2001). "[Generation of new cardiomyocytes in the adult heart: Prospects of myocardial regeneration as an alternative to cardiac transplantation]." *Rev Esp Cardiol* **54**(5): 543-50.
- Nebreda, A. R. and A. Porras (2000). "p38 MAP kinases: beyond the stress response." *Trends Biochem Sci* **25**(6): 257-60.
- Neer, E. J. (1995). "Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals." *Cell* **80**(2): 249-57.
- New, L. and J. Han (1998). "The p38 MAP kinase pathway and its biological function." *Trends Cardiovasc Med* **8**(5): 220-8.
- Nijboer, C. H., C. J. Heijnen, et al. (2009). "Cell-specific roles of GRK2 in onset and severity of hypoxic-ischemic brain damage in neonatal mice." *Brain Behav Immun*.
- Nijboer, C. H., A. Kavelaars, et al. (2008). "Low endogenous G-protein-coupled receptor kinase 2 sensitizes the immature brain to hypoxia-ischemia-induced gray and white matter damage." *J Neurosci* **28**(13): 3324-32.
- Nishikimi, T., N. Maeda, et al. (2006). "The role of natriuretic peptides in cardioprotection." *Cardiovasc Res* **69**(2): 318-28.
- Noma, T., A. Lemaire, et al. (2007). "Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection." *J Clin Invest* **117**(9): 2445-58.
- Ocaranza, M. P. and J. E. Jalil (2009). "Mitogen-activated protein kinases as biomarkers of hypertension or cardiac pressure overload." *Hypertension* **55**(1): 23-5.
- Ogier-Denis, E., S. Pattingre, et al. (2000). "Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells." *J Biol Chem* **275**(50): 39090-5.
- Okin, P. M., R. B. Devereux, et al. (2004). "Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive treatment and the prediction of major cardiovascular events." *Jama* **292**(19): 2343-9.
- Olzinski, A. R., T. A. McCafferty, et al. (2005). "Hypertensive target organ damage is attenuated by a p38 MAPK inhibitor: role of systemic blood pressure and endothelial protection." *Cardiovasc Res* **66**(1): 170-8.
- Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." *Cell Signal* **12**(1): 1-13.
- Opie, L. H., P. J. Commerford, et al. (2006). "Controversies in ventricular remodelling." *Lancet* **367**(9507): 356-67.
- Oyama, N., K. Urasawa, et al. (2005). "Chronic beta-adrenergic receptor stimulation enhances the expression of G-Protein coupled receptor kinases, GRK2 and GRK5, in both the heart and peripheral lymphocytes." *Circ J* **69**(8): 987-90.
- Pang, T., X. T. Gan, et al. (2009). "Compensatory upregulation of the adenosine system following phenylephrine-induced hypertrophy in cultured rat ventricular myocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**(2): H545-53.
- Pao, C. S., B. L. Barker, et al. (2009). "Role of the amino terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 in receptor phosphorylation." *Biochemistry* **48**(30): 7325-33.
- Paradis, P., N. Dali-Youcef, et al. (2000). "Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 931-6.
- Parameswaran, N., C. S. Pao, et al. (2006). "Arrestin-2 and G protein-coupled receptor kinase 5 interact with NFkappaB1 p105 and negatively regulate lipopolysaccharide-stimulated ERK1/2 activation in macrophages." *J Biol Chem* **281**(45): 34159-70.
- Patrizio, M., M. Musumeci, et al. (2008). "Propranolol promotes Egr1 gene expression in cardiomyocytes via beta-adrenoceptors." *Eur J Pharmacol* **587**(1-3): 85-9.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* **22**(2): 153-83.
- Penela, P., C. Murga, et al. (2008). "G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in migration and inflammation." *Arch Physiol Biochem* **114**(3): 195-200.
- Penela, P., C. Murga, et al. (2006). "Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease." *Cardiovasc Res* **69**(1): 46-56.
- Penela, P., C. Ribas, et al. (2008). "G protein-coupled receptor kinase 2 positively regulates epithelial cell migration." *Embo J* **27**(8): 1206-18.
- Penela, P., C. Ribas, et al. (2003). "Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases." *Cell Signal* **15**(11): 973-81.
- Penela, P., V. Rivas, et al. (2009). "G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) modulation and cell cycle progression." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Penela, P., V. Rivas, et al. (2010). "G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) modulation and cell cycle progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(3): 1118-23.
- Penela, P., A. Ruiz-Gomez, et al. (1998). "Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway." *J Biol Chem* **273**(52): 35238-44.
- Peregrin, S., M. Jurado-Pueyo, et al. (2006). "Phosphorylation of p38 by GRK2 at the docking groove unveils a novel mechanism for inactivating p38MAPK." *Curr Biol* **16**(20): 2042-7.
- Petrich, B. G. and Y. Wang (2004). "Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies." *Trends Cardiovasc Med* **14**(2): 50-5.
- Peyssonnaud, C. and A. Eychene (2001). "The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation." *Biol*

- Cell* **93**(1-2): 53-62.
- Pierce, K. L., R. T. Premont, et al. (2002). "Seven-transmembrane receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 639-50.
- Ping, P., T. Anzai, et al. (1997). "Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure." *Am J Physiol* **273**(2 Pt 2): H707-17.
- Pitcher, J. A., N. J. Freedman, et al. (1998). "G protein-coupled receptor kinases." *Annu Rev Biochem* **67**: 653-92.
- Pitcher, J. A., J. J. Tesmer, et al. (1999). "Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases." *J Biol Chem* **274**(49): 34531-4.
- Pols, T. W., P. I. Bonta, et al. (2007). "NR4A nuclear orphan receptors: protective in vascular disease?" *Curr Opin Lipidol* **18**(5): 515-20.
- Porras, A., S. Zuluaga, et al. (2004). "P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli." *Mol Biol Cell* **15**(2): 922-33.
- Pouyssegur, J., V. Volmat, et al. (2002). "Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling." *Biochem Pharmacol* **64**(5-6): 755-63.
- Premont, R. T., A. Claing, et al. (1998). "beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14082-7.
- Premont, R. T., J. Inglese, et al. (1995). "Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors." *Faseb J* **9**(2): 175-82.
- Raake, P. W., L. E. Vinge, et al. (2008). "G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure." *Circ Res* **103**(4): 413-22.
- Raingeaud, J., S. Gupta, et al. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." *J Biol Chem* **270**(13): 7420-6.
- Rajagopal, K., R. J. Lefkowitz, et al. (2005). "When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors." *J Clin Invest* **115**(11): 2971-4.
- Ramos-Ruiz, R., P. Penela, et al. (2000). "Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells." *Circulation* **101**(17): 2083-9.
- Rebsamen, M. C., R. Capoccia, et al. (2003). "Role of cyclooxygenase 2, p38 and p42/44 MAPK in the secretion of prostacyclin induced by epidermal growth factor, endothelin-1 and angiotensin II in rat ventricular cardiomyocytes." *J Mol Cell Cardiol* **35**(1): 81-9.
- Reinhardt, H. C., A. S. Aslanian, et al. (2007). "p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage." *Cancer Cell* **11**(2): 175-89.
- Reiter, E. and R. J. Lefkowitz (2006). "GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling." *Trends Endocrinol Metab* **17**(4): 159-65.
- Ren, X. R., E. Reiter, et al. (2005). "Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(5): 1448-53.
- Ribas, C., P. Penela, et al. (2007). "The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling." *Biochim Biophys Acta* **1768**(4): 913-22.
- Risebro, C. A., R. G. Searles, et al. (2009). "Prox1 maintains muscle structure and growth in the developing heart." *Development* **136**(3): 495-505.
- Ritter, S. L. and R. A. Hall (2009). "Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(12): 819-30.
- Roberts, P. J. and C. J. Der (2007). "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer." *Oncogene* **26**(22): 3291-310.
- Rockman, H. A., K. R. Chien, et al. (1998). "Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 7000-5.
- Rockman, H. A., D. J. Choi, et al. (1998). "Control of myocardial contractile function by the level of beta-adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice." *J Biol Chem* **273**(29): 18180-4.
- Rouse, J., P. Cohen, et al. (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." *Cell* **78**(6): 1027-37.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2): 320-44.
- Rudd, C. E. (2005). "MAPK p38: alternative and nonstressful in T cells." *Nat Immunol* **6**(4): 368-70.
- Rutter, M. K., H. Parise, et al. (2003). "Impact of glucose intolerance and insulin resistance on cardiac structure and function: sex-related differences in the Framingham Heart Study." *Circulation* **107**(3): 448-54.
- Salcedo, A., F. Mayor, Jr., et al. (2006). "Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2." *Embo J* **25**(20): 4752-62.
- Santiago, C., B. Pagan, et al. (2007). "Prolonged chronic inflammation progresses to dysplasia in a novel rat model of colitis-associated colon cancer." *Cancer Res* **67**(22): 10766-73.
- Sarnago, S., R. Roca, et al. (2003). "Involvement of intramolecular interactions in the regulation of G protein-coupled receptor kinase 2." *Mol Pharmacol* **64**(3): 629-39.
- Sato, M., J. B. Blumer, et al. (2006). "Accessory proteins for G proteins: partners in signaling." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 151-87.
- Schafer, P. H., L. Wang, et al. (1999). "T cell activation signals up-regulate p38 mitogen-activated protein kinase activity and induce TNF-alpha production in a manner distinct from LPS activation of monocytes." *J Immunol* **162**(2): 659-68.
- Schilham, M. W., M. A. Oosterwegel, et al. (1996). "Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4." *Nature* **380**(6576): 711-4.

- Schutzer, W. E., J. F. Reed, et al. (2001). "Upregulation of G protein-linked receptor kinases with advancing age in rat aorta." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**(3): R897-903.
- Sealfon, S. C. (2005). "G Protein-Coupled Receptors." *Sci STKE* **2005**(279): tr11.
- Shenoy, S. K., M. T. Drake, et al. (2006). "beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor." *J Biol Chem* **281**(2): 1261-73.
- Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2005). "Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin" *Sci STKE* **2005** (308): cm10.
- Shibasaki, Y., H. Ishihara, et al. (1997). "Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in vivo." *J Biol Chem* **272**(12): 7578-81.
- Skjoth, I. H. and O. G. Issinger (2006). "Profiling of signaling molecules in four different human prostate carcinoma cell lines before and after induction of apoptosis." *Int J Oncol* **28**(1): 217-29.
- Sorriento, D., M. Ciccarelli, et al. (2008). "The G-protein-coupled receptor kinase 5 inhibits NFkappaB transcriptional activity by inducing nuclear accumulation of IkappaB alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(46): 17818-23.
- Spiegelberg, B. D. and H. E. Hamm (2007). "Roles of G-protein-coupled receptor signaling in cancer biology and gene transcription." *Curr Opin Genet Dev* **17**(1): 40-4.
- Sterne-Marr, R. and J. L. Benovic (1995). "Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins." *Vitam Horm* **51**: 193-234.
- Strom, C. C., M. Aplin, et al. (2005). "Expression profiling reveals differences in metabolic gene expression between exercise-induced cardiac effects and maladaptive cardiac hypertrophy." *Febs J* **272**(11): 2684-95.
- Sugden, P. H., S. J. Fuller, et al. (2008). "Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis." *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**: S137-53.
- Susic, D. and E. D. Frohlich (2008). "The aging hypertensive heart: a brief update." *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **5**(2): 104-10.
- Sutsch, G. and M. Barton (1999). "Endothelin in heart failure." *Curr Hypertens Rep* **1**(1): 62-8.
- Suzuki, N., N. Hajicek, et al. (2009). "Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways." *Neurosignals* **17**(1): 55-70.
- Swirnoff, A. H., E. D. Apel, et al. (1998). "Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain." *Mol Cell Biol* **18**(1): 512-24.
- Tanoue, T., R. Maeda, et al. (2001). "Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions." *Embo J* **20**(3): 466-79.
- Tenhunen, O., J. Rysa, et al. (2006). "Identification of cell cycle regulatory and inflammatory genes as predominant targets of p38 mitogen-activated protein kinase in the heart." *Circ Res* **99**(5): 485-93.
- Theilade, J., C. Strom, et al. (2003). "Differential G protein receptor kinase 2 expression in compensated hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat." *Basic Res Cardiol* **98**(2): 97-103.
- Thompson, M. D., W. M. Burnham, et al. (2005). "The G protein-coupled receptors: pharmacogenetics and disease." *Crit Rev Clin Lab Sci* **42**(4): 311-92.
- Thompson, M. D., M. E. Percy, et al. (2008). "G protein-coupled receptors disrupted in human genetic disease." *Methods Mol Biol* **448**: 109-37.
- Thornton, T. M. and M. Rincon (2009). "Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival." *Int J Biol Sci* **5**(1): 44-51.
- Torii, S., M. Kusakabe, et al. (2004). "Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling." *Dev Cell* **7**(1): 33-44.
- Triviño J. C., S.-F. J. C., Oliveros J. C. (2007). "Researcher's DIGEST. Using text-mining techniques for classifying list of genes. Critical Assessment of Microarray Databases." *CAMDA07*.
- Ueda, H., R. Nagae, et al. (2008). "Heterotrimeric G protein betagamma subunits stimulate FLJ00018, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42." *J Biol Chem* **283**(4): 1946-53.
- Ueyama, T., S. Kawashima, et al. (2000). "Requirement of activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade in myocardial cell hypertrophy." *J Mol Cell Cardiol* **32**(6): 947-60.
- Ungerer, M., M. Bohm, et al. (1993). "Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart." *Circulation* **87**(2): 454-63.
- Ungerer, M., K. Kessebohm, et al. (1996). "Activation of beta-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia." *Circ Res* **79**(3): 455-60.
- Usui, I., T. Imamura, et al. (2005). "G protein-coupled receptor kinase 2 mediates endothelin-1-induced insulin resistance via the inhibition of both Galphaq/11 and insulin receptor substrate-1 pathways in 3T3-L1 adipocytes." *Mol Endocrinol* **19**(11): 2760-8.
- Usui, I., T. Imamura, et al. (2004). "GRK2 is an endogenous protein inhibitor of the insulin signaling pathway for glucose transport stimulation." *Embo J* **23**(14): 2821-9.
- van Bilsen, M., F. A. van Nieuwenhoven, et al. (2009). "Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental?" *Cardiovasc Res* **81**(3): 420-8.
- van den Blink, B., N. P. Juffermans, et al. (2001). "p38 mitogen-activated protein kinase inhibition increases cytokine release by macrophages in vitro and during infection in vivo." *J Immunol* **166**(1): 582-7.
- Vinge, L. E., E. Oie, et al. (2001). "Myocardial distribution and regulation of GRK and beta-arrestin isoforms in congestive heart failure in rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(6): H2490-9.
- Voyno-Yasenetskaya, T. A., M. P. Faure, et al. (1996). "Galpha12 and Galpha13 regulate extracellular signal-regulated kinase and c-Jun kinase pathways by different mechanisms in COS-7 cells." *J Biol Chem* **271**(35): 21081-7.
- Vroon, A., C. J. Heijnen, et al. (2006). "GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation." *J Leukoc Biol* **80**(6): 1214-21.
- Vroon, A., C. J. Heijnen, et al. (2004). "Reduced GRK2 level in T cells potentiates chemotaxis and signaling in response to CCL4." *J Leukoc Biol* **75**(5): 901-9.
- Vroon, A., A. Kavelaars, et al. (2005). "G protein-coupled

- receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **174**(7): 4400-6.
- Wakatsuki, T., J. Schlessinger, et al. (2004). "The biochemical response of the heart to hypertension and exercise." *Trends Biochem Sci* **29**(11): 609-17.
- Wang, C. C., G. Sharma, et al. (2006). "Early growth response gene-1 expression in vascular smooth muscle cells effects of insulin and oxidant stress." *Am J Hypertens* **19**(4): 366-72.
- Wang, D. and S. J. Lippard (2004). "Cisplatin-induced post-translational modification of histones H3 and H4." *J Biol Chem* **279**(20): 20622-5.
- Wang, S., J. Yang, et al. (2006). "Tumor evasion of the immune system: inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma." *Blood* **107**(6): 2432-9.
- Wang, Y. (2007). "Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases." *Circulation* **116**(12): 1413-23.
- Wang, Y., S. Huang, et al. (1998). "Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family." *J Biol Chem* **273**(4): 2161-8.
- Werry, T. D., P. M. Sexton, et al. (2005). "Ins and outs" of seven-transmembrane receptor signalling to ERK." *Trends Endocrinol Metab* **16**(1): 26-33.
- Whalen, E. J., M. W. Foster, et al. (2007). "Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2." *Cell* **129**(3): 511-22.
- Willems, J. M., R. A. Challiss, et al. (2003). "Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture?" *Trends Pharmacol Sci* **24**(12): 626-33.
- Winstel, R., H. G. Ihlenfeldt, et al. (2005). "Peptide inhibitors of G protein-coupled receptor kinases." *Biochem Pharmacol* **70**(7): 1001-8.
- Worzfeld, T., N. Wettschureck, et al. (2008). "G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease." *Trends Pharmacol Sci* **29**(11): 582-9.
- Yi, X. P., J. Zhou, et al. (2005). "Myocardial expression and redistribution of GRKs in hypertensive hypertrophy and failure." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **282**(1): 13-23.
- Yin, G., J. Haendeler, et al. (2004). "GIT1 functions as a scaffold for MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation by angiotensin II and epidermal growth factor." *Mol Cell Biol* **24**(2): 875-85.
- Zarain-Herzberg, A. (2006). "Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase expression in the hypertrophic and failing heart." *Can J Physiol Pharmacol* **84**(5): 509-21.
- Zarubin, T. and J. Han (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway." *Cell Res* **15**(1): 11-8.
- Zechner, D., R. Craig, et al. (1998). "MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner." *J Biol Chem* **273**(14): 8232-9.
- Zhai, P., M. Yamamoto, et al. (2005). "Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G alpha q/G alpha i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice." *J Clin Invest* **115**(11): 3045-56.
- Zhang, S., C. Weinheimer, et al. (2003). "The role of the Grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis." *J Clin Invest* **111**(6): 833-41.
- Zhao, Z. S., J. P. Lim, et al. (2005). "The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A." *Mol Cell* **20**(2): 237-49.
- Zhu, D., K. S. Kosik, et al. (2004). "Galpha12 directly interacts with PP2A: evidence FOR Galpha12-stimulated PP2A phosphatase activity and dephosphorylation of microtubule-associated protein, tau." *J Biol Chem* **279**(53): 54983-6.
- Zuluaga, S., A. Alvarez-Barrientos, et al. (2007). "Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1." *Cell Signal* **19**(1): 62-74.